

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL 70% ALFALFA (*Medicago sativa* L.)
SEBAGAI SUMBER ANTIOKSIDAN TERHADAP MOTILITAS DAN
VIABILITAS SPERMATOZOA *Mus musculus* SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

**Oleh:
SHOFIA AZZAHRA
NIM. 220602110126**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2026**

HALAMAN JUDUL

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL 70% ALFALFA (*Medicago sativa* L.)
SEBAGAI SUMBER ANTIOKSIDAN TERHADAP MOTILITAS DAN
VIABILITAS SPERMATOZOA *Mus musculus* SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

**Oleh:
SHOFIA AZZAHRA
NIM. 220602110126**

**Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan
Dalam Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2026**

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh:

Nama : Shofia Azzahra
NIM : 220602110126
Program Studi : Biologi
Judul Penelitian : PENGARUH EKSTRAK ETANOL 70% ALFALFA
(*Medicago sativa* L.) SEBAGAI SUMBER
ANTIOKSIDAN TERHADAP MOTILITAS DAN
VIABILITAS SPERMATOZOA *Mus musculus* SECARA
IN VITRO

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji pada tanggal 18 Juni 2026 dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana pada Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Kholifah Holil, M.Si
NIP. 19751106 200912 2 002 (.....)

Pembimbing II: Didik Wahyudi, M.Si
NIP. 19860102 201801 1 001 (.....)

Tim Penguji : Prof. Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si
NIP. 19710919 200003 2 001 (Ketua) (.....)

Fitria Nungky Harjanti, M.Sc
NIP. 19870528 202203 2 002 (Anggota) (.....)

Ketua Program Studi Biologi



Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si
NIP. 19671113 199402 2 001

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillahirobbil'alamiin, segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala rahmat dan nikmat yang telah mengiringi setiap langkah dalam menyelesaikan skripsi ini. Shalawat serta salam tercurah kepada Rasulullah SAW, pemimpin umat yang senantiasa menunjukkan jalan menuju kebaikan. Sebagai bentuk penghormatan dan ungkapan terima kasih, skripsi ini penulis persembahkan kepada:

1. Penyemangat terbesar dalam hidupku dan sumber kasih sayangku, Buya Teguh Hidayat dan Umi Nuraini. Terima kasih atas setiap doa yang tidak pernah terputus, cinta yang selalu menguatkan, serta perjuangan yang tiada henti demi masa depanku. Terima kasih telah menjadi tempat pulang ternyaman, penguat di setiap proses kehidupan, dan alasan terbesar bagiku untuk terus berjuang hingga mampu menyelesaikan pendidikan ini. Semoga Allah *Subhanahu wa ta'ala* senantiasa menjaga, melimpahkan kesehatan, kebahagiaan, dan keberkahan umur kepada Buya dan Umi.
2. *Partner in crime* dan saudara kandung satu-satunya, Abang Muhammad Dhiyaul Khoiri yang juga sedang berjuang menempuh pendidikan di Yaman. Terima kasih karena selalu menjadi tempat berbagi cerita, memberikan semangat, dukungan, dan doa di setiap proses yang kulewati. Untuk Mbak Farisa Lindariansyah, terima kasih telah hadir sebagai pendengar yang baik, pemberi semangat di masa sulit, dan seseorang yang tidak pernah lupa dengan segelas matcha yang selalu berhasil memperbaiki suasana. Terima kasih telah menjadi bagian dari perjalanan ini.
3. Teman-temanku semasa SMA yang hingga saat ini masih berjalan bersama, Azizah dan Sephia Faradis. Terima kasih telah menjadi tempat berbagi cerita, keluh kesah, dan perjuangan selama proses penyusunan skripsi ini. Terima kasih karena selalu hadir dengan dukungan, semangat, dan tawa yang membuat setiap proses terasa lebih ringan untuk dilalui.
4. Teman sedekat nadiku, Jihan Ihza Nabila. Terima kasih sudah bersedia menjadi bagian dari setiap proses perjalanan hidupku. Terima kasih telah menjadi tempat bertukar pikiran, berbagi cerita, dan tempat pulang di tengah lelahnya proses penyusunan skripsi ini. Terima kasih karena selalu hadir dengan dukungan, perhatian, dan semangat yang membuatku mampu bertahan hingga sampai di titik ini.
5. Teman-teman Biologi Arteria, khususnya Wilda dan Nahdya. Terima kasih telah menjadi teman belajar, teman bertumbuh, dan teman seperjuangan selama masa perkuliahan ini. Terima kasih atas setiap tawa, cerita, dukungan, serta kebersamaan yang menemani di setiap suka dan duka hingga akhirnya mampu sampai pada tahap ini.
6. Teman-teman sepenelitian dan seperbimbingan. Terima kasih telah menjadi rekan berjuang dalam menyelesaikan penelitian ini, saling membantu, bertukar ilmu, serta saling menguatkan selama proses bimbingan dan penyusunan skripsi. Terima kasih atas kebersamaan, dukungan, dan cerita yang telah menjadi bagian dari perjalanan ini.
7. Teman-teman kamar 36 Mabna Khadijah Al-Kubro serta teman-teman KKN Cakra Bhakti. Terima kasih atas kebersamaan, cerita, dukungan, dan kenangan yang telah diberikan selama proses perjalanan ini. Terima kasih telah menjadi

bagian dari hari-hari yang penuh pembelajaran, tawa, dan pengalaman berharga yang tidak akan terlupakan.

8. Terakhir, untuk diri sendiri, Shofia Azzahra. Terima kasih sudah mampu bertahan sejauh ini, meskipun banyak hal yang tidak mudah untuk dilalui. Terima kasih karena tidak menyerah di tengah rasa lelah, kecewa, takut, dan segala keraguan yang datang selama proses menyelesaikan pendidikan ini. Banyak hal yang berhasil dilewati sampai berada di titik ini. Tangis, lelah, revisi yang tidak ada habisnya, rasa ingin menyerah, serta hari-hari penuh tekanan akhirnya mampu dilalui dengan baik. Terima kasih sudah belajar untuk bangkit berkali-kali, belajar menerima proses, dan belajar memahami bahwa tidak apa-apa berjalan lebih pelan selama tidak berhenti. Semua yang sudah diperjuangkan selama ini adalah bukti bahwa diri ini kuat dan mampu melewati hal-hal yang dulu terasa mustahil. *So proud of you, ra!* Terima kasih sudah menjadi pribadi yang tetap bertahan sampai akhir. Semoga langkah ke depan selalu dipenuhi kebahagiaan, keberkahan, kesehatan, dan hal-hal yang telah lama diperjuangkan. Semoga Allah *Subhanahu wa ta'ala* selalu menjaga hati dan langkah ini ke mana pun kehidupan akan membawa pergi. Ra setelah ini ayo healing pulang kampung ke Medan! Terima kasih sudah berjuang sejauh ini, sekarang izinkan diri ini beristirahat sejenak dan menikmati setiap hal baik yang akhirnya berhasil diraih.

MOTTO

“Allah tidak akan membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya”

(QS. Al – Baqarah 2:286)

“Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan.

Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan”

(QS. Al -Insyirah 94: 5-6)

“The act of pursuing something may be even more precious than achieving it. I believe that being in the process itself is a reward. Even when you feel stressed, see it as meaningful growth and enjoy the journey because that is what makes it valuable”

-Mark Lee

HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Shofia Azzahra
NIM : 220602110126
Program Studi : Biologi
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : PENGARUH EKSTRAK ETANOL 70% ALFALFA
(*Medicago sativa* L.) SEBAGAI SUMBER
ANTIOKSIDAN TERHADAP MOTILITAS DAN
VIABILITAS SPERMATOZOA *Mus musculus*
SECARA *IN VITRO*

menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi akademik maupun hukum atas perbuatan tersebut.

Malang, 25 Juni 2026

Yang membuat pernyataan,



Shofia Azzahra

NIM. 220602110126

HALAMAN PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

PENGARUH EKSTRAK ETANOL 70% ALFALFA (*Medicago sativa* L.) SEBAGAI SUMBER ANTIOKSIDAN TERHADAP MOTILITAS DAN VIABILITAS SPERMATOZOA *Mus musculus* SECARA *IN VITRO*

Shofia Azzahra, Kholifah Holil, dan Didik Wahyudi

Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi,
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

ABSTRAK

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) merupakan tanaman leguminosa yang mengandung senyawa bioaktif yang berperan sebagai antioksidan alami. Senyawa flavonoid mampu menetralkan radikal bebas penyebab stres oksidatif yang dapat menurunkan kualitas spermatozoa, terutama motilitas dan viabilitas. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol 70% alfalfa terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa *Mus musculus* secara *in vitro*. Jenis penelitian ini menggunakan eksperimen laboratorium dengan rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri atas empat perlakuan ekstrak alfalfa, yaitu kontrol, 2%, 4% dan 6%, dengan enam ulangan. Spermatozoa *Mus musculus* diisolasi dari cauda epididimis, kemudian dicacah dalam larutan NaCl fisiologis 0,9% hingga terbentuk suspensi spermatozoa. Suspensi spermatozoa selanjutnya dicampurkan ke dalam medium yang mengandung ekstrak alfalfa sesuai perlakuan dan diinkubasi selama 30 menit. Data dianalisis menggunakan *One Way ANOVA* setelah memenuhi uji normalitas dan homogenitas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak alfalfa tidak berpengaruh terhadap motilitas spermatozoa. Namun, konsentrasi 4% (perlakuan E2) mengindikasikan kemampuan yang lebih baik dalam mempertahankan motilitas spermatozoa dibandingkan perlakuan lainnya. Pemberian ekstrak alfalfa pada parameter viabilitas berpengaruh terhadap viabilitas spermatozoa mencit secara *in vitro*. Perlakuan E2 (konsentrasi 4%) menunjukkan kemampuan tertinggi dalam mempertahankan viabilitas spermatozoa dibandingkan perlakuan lainnya. Dengan demikian, ekstrak etanol 70% alfalfa berpotensi sebagai sumber antioksidan alami dalam membantu mempertahankan kualitas spermatozoa.

Kata kunci: antioksidan, flavonoid, *Medicago sativa* L., *Mus musculus*, motilitas, spermatozoa, viabilitas.

**EFFECT OF ETHANOL EXTRACT 70% ALFALFA (*Medicago sativa* L.)
AS A SOURCE OF ANTIOXIDANTS FOR THE MOTILITY AND
VIABILITY OF *Mus musculus* SPERMATOZOA IN *VITRO***

Shofia Azzahra, Kholifah Holil, dan Didik Wahyudi

Biology Study Program, Faculty of Science and Technology,
Maulana Malik Ibrahim State Islamic University Malang

ABSTRACT

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) is a leguminosa plant that contains bioactive compounds that act as natural antioxidants. Flavonoid compounds are able to neutralize free radicals that cause oxidative stress that can degrade the quality of spermatozoa, especially motility and viability. Therefore, this study aims to determine the effect of 70% alfalfa ethanol extract on the motility and viability of *Mus musculus spermatozoa* in *vitro*. This type of study uses a laboratory experiment with a complete random design (RAL) consisting of four alfalfa extract treatments, namely controls, 2%, 4% and 6%, with six replicas. *Mus musculus* spermatozoa are isolated from the cauda epididymis, then chopped in a 0.9% physiological NaCl solution until spermatozoa suspension is formed. The spermatozoa suspension was then mixed into a medium containing alfalfa extract as per the treatment and incubated for 30 minutes. The data were analyzed using *One Way ANOVA* after meeting the normality and homogeneity tests. The results showed that the administration of alfalfa extract had no effect on spermatozoa motility. However, the concentration of 4% (E2 treatment) indicated a better ability to maintain spermatozoa motility than other treatments. The administration of alfalfa extract at the viability parameters affects the viability of mouse spermatozoa in *vitro*. The E2 treatment (concentration of 4%) showed the highest ability to maintain spermatozoa viability compared to other treatments. Thus, 70% alfalfa ethanol extract has the potential to be a natural source of antioxidants in helping to maintain the quality of spermatozoa.

Keywords: antioxidants, flavonoids, *Medicago sativa* L., *Mus musculus*, motility, spermatozoa, viability.

أثر مستخرجة الإيثانول 70٪ لنبات البرسيم الحجازي (*Medicago sativa L.*) بوصفه مصدرًا لمضادة الأكسدة في حركية وحيوية الحيوانات المنوية لدى الفأر المنزلي (*Mus musculus*) في المختبر

صافية الزهراء، خليفة خليل، ديديك وحيودي

قسم علم الأحياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج

الملخص

تُعدّ نبات البرسيم الحجازي (*Medicago sativa L.*) من النباتات البقولية التي تحتوي على مركبات حيوية فعالة تؤدي دورًا مهمًا بوصفها مضادات أكسدة طبيعية. وتتميز مركبات الفلافونويد بقدرتها على معادلة الجذور الحرة المسببة للإجهاد التأكسدي، الذي قد يؤدي إلى انخفاض جودة الحيوانات المنوية، ولا سيما من حيث الحركة والحيوية. لذلك هدف هذا البحث إلى معرفة أثر مستخرجة الإيثانول 70٪ لنبات البرسيم الحجازي في حركية وحيوية الحيوانات المنوية لدى الفأر المنزلي المختبر. اعتمد البحث المنهج التجريبي المخبري باستخدام تصميم عشوائي كامل (*Completely Randomized Design*)، وتضمنت أربع معاملات لمستخرجة البرسيم الحجازي هي: مجموعة بتركيز 2٪، وتركيز 4٪، وتركيز 6٪، مع ست مكررات لكل معاملة. وتم عزل الحيوانات المنوية لفأر التجارب من ذيل البربخ (*Cauda Epididymis*)، ثم تقطيعها في محلول كلوريد الصوديوم الفسيولوجي بتركيز 0.9٪ للحصول على معلق للحيوانات المنوية. وبعد ذلك خلط المعلق مع وسط يحتوي على مستخرجة البرسيم الحجازي وفقًا للمعاملات المختلفة، ثم حُضِنَ لمدة ثلاثين دقيقة. وحُلِّلت البيانات باستخدام اختبار تحليل التباين الأحادي (*ANOVA*) بعد التأكد من تحقق اختباري التوزيع الطبيعي والتجانس. أظهرت النتائج أن إضافة مستخرجة البرسيم الحجازي لم تُحدث تأثيرًا معنويًا في حركية الحيوانات المنوية. ومع ذلك، أشارت المعاملة ذات التركيز 4٪ (*E2*) إلى قدرة أفضل على المحافظة على حركة الحيوانات المنوية مقارنةً بالمعاملات الأخرى. أما بالنسبة لمؤشر الحيوية، فقد كان لمستخرجة البرسيم الحجازي تأثير معنوي في حيوية الحيوانات المنوية للفأر في المختبر. وأظهرت المعاملة *E2* (بتركيز 4٪) أعلى قدرة على المحافظة على حيوية الحيوانات المنوية مقارنةً ببقية المعاملات. وبناءً على ذلك، يمكن الاستنتاج أن متخرجة الإيثانول 70٪ لنبات البرسيم الحجازي يمتلك إمكانات واعدة بوصفه مصدرًا طبيعيًا لمضادة الأكسدة يساهم في المحافظة على جودة الحيوانات المنوية

الكلمات المفتاحية: برسيم حجازي، حيوانات منوية، حيوية، حركية، مضادة أكسدة، فأر منزلي، فلافونويدات.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah wa Syukrulillah senantiasa terpanjatkan kepada Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayah-nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Ekstrak Etanol 70% Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Terhadap Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa *Mus musculus* Secara *in vitro*”. Shalawat serta salam semoga senantiasa tercurahkan kepada junjungan Nabi Muhammad SAW sebagai pembawa risalah yang kekal hingga akhir zaman. Penulis dengan hormat menyampaikan ucapan terima kasih kepada seluruh pihak yang memberikan kontribusi dalam penyusunan proposal. Penulis ingin menyampaikan rasa terimakasih kepada:

1. Prof. Dr. Hj. Ilfi Nur Diana, M.Si., CAHRM., CRMP., selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Agus Mulyono, M.Kes., selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si., selaku Ketua Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Kholifah Holil, M.Si., selaku dosen pembimbing skripsi yang telah memberikan bimbingan, arahan, dan masukan dalam penyusunan skripsi.
5. Bapak Didik Wahyudi, M.Si., selaku dosen pembimbing agama yang telah memberikan bimbingan, arahan, dan masukan terkait integrasi Sains dan Islam dalam kepenulisan skripsi.
6. Ibu Fitriyah, M.Si., selaku dosen wali yang telah membimbing dan memberikan motivasi sehingga penulis dapat menyusun skripsi dengan baik.
7. Kedua orang tua yang berjasa dalam hidup penulis. Terima kasih sudah selalu mendo'akan untuk kebaikan penulis, selalu memberikan kasih sayang, dukungan dan motivasi.

Penulis berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi diri penulis sendiri maupun para pembacanya.

Malang, 26 Mei 2026

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iv
MOTTO	vi
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN	vii
HALAMAN PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	viii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
الملخص	xi
KATA PENGANTAR.....	xii
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
DAFTAR SINGKATAN	xviii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	7
1.3 Tujuan.....	7
1.4 Manfaat.....	7
1.5 Batasan Masalah	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.)	9
2.1.1 Morfologi	9
2.1.2 Kandungan dan Manfaat	11
2.2 <i>Mus musculus</i>	16
2.2.1 Sistem Reproduksi Mencit	16
2.2.2 Spermatozoa.....	17
2.3 Radikal Bebas dan Antioksidan.....	20
2.4 Pengaruh Ekstrak Alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.) terhadap Kualitas spermatozoa	27
2.5 Metode Ekstraksi	31
2.5.1 Ekstraksi Maserasi	32
2.6 Media Pengencer	33
2.7 Hipotesis	34
BAB III METODE PENELITIAN	35
3.1 Jenis dan Pendekatan Penelitian	35
3.2 Waktu dan Tempat.....	35
3.3 Rancangan Penelitian	35
3.4 Variabel Penelitian	36
3.5 Alat dan Bahan	36
3.5.1 Alat.....	36
3.5.2 Bahan.....	36
3.6 Prosedur Penelitian	37
3.6.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Alfalfa	37
3.6.2 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.)... 37	

3.6.3 Aklimatisasi dan Isolasi Organ Reproduksi	37
3.6.4 Perlakuan Ekstrak Etanol 70% Alfalfa pada Spermatozoa	38
3.6.5 Uji Motilitas	39
3.6.6 Uji Viabilitas	40
3.7 Analisis Data.....	41
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	42
4.1 Pengaruh Ekstrak Etanol 70% Alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.) terhadap Motilitas Spermatozoa mencit (<i>Mus musculus</i>) secara <i>in vitro</i>	42
4.2 Pengaruh Ekstrak Etanol 70% Alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.) terhadap Viabilitas Spermatozoa secara <i>in vitro</i>	53
BAB V PENUTUP.....	60
5.1 Kesimpulan	60
5.2 Saran	60
DAFTAR PUSTAKA	61
LAMPIRAN.....	69

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 3.1 Komposisi Perlakuan Ekstrak Etanol Alfalfa.....	39
Tabel 4.1 Rerata pengaruh ekstrak etanol 70% alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.) terhadap motilitas spermatozoa mencit (<i>Mus musculus</i>)	43
Tabel 4.2 Rerata penurunan viabilitas spermatozoa mencit (<i>Mus musculus</i>) setelah pemberian ekstrak etanol 70% alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.) secara <i>in vitro</i>	54
Tabel 4.3 Hasil uji lanjut duncan pengaruh ekstrak etanol 70% alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.) terhadap viabilitas spermatozoa mencit (<i>Mus musculus</i>) secara <i>in vitro</i>	57

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 2.1 Morfologi <i>Medicago sativa</i> L..	10
Gambar 2.2 Struktur dasar flavonoid.	14
Gambar 2. 3 Struktur spermatozoa <i>Mus musculus</i>	17
Gambar 2. 4 Pembentukan ROS	21
Gambar 2.5 Peran ROS dalam proses fisiologis dan patologis spermatozoa.	24
Gambar 2.6 Klasifikasi antioksidan utama menjadi enzimatis dan non-enzimatis.	26
Gambar 2. 7 Mekanisme antioksidan terhadap stress oksidatif.....	28
Gambar 2. 8 Peredaman Radikal Bebas oleh Flavonoid.....	29
Gambar 4.1 Rerata penurunan motilitas spermatozoa <i>Mus musculus</i> secara <i>in vitro</i> setelah pemberian ekstrak etanol 70% alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.)	50
Gambar 4.2 Hasil pengamatan spermatozoa pada uji viabilitas menggunakan mikroskop cahaya pada perbesaran 400x dengan pewarna eosin nigrosin	53

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1. Tabel Perhitungan Rerata Motilitas	69
Lampiran 2. Analisis Motilitas secara statistik	69
Lampiran 3. Tabel Perhitungan Rerata Viabilitas	70
Lampiran 4. Analisis Viabilitas secara Statistik	71
Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian	73

DAFTAR SINGKATAN

Singkatan/ Simbol	Keterangan
%	persen
°C	derajat Celsius
µg	mikrogram
µL	mikroliter
µm	mikrometer
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>
CAT	<i>Catalase</i>
cm	sentimeter
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DPPH	<i>2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl</i>
E0	Perlakuan kontrol (0% ekstrak alfalfa)
E1	Perlakuan ekstrak alfalfa konsentrasi 2%
E2	Perlakuan ekstrak alfalfa konsentrasi 4%
E3	Perlakuan ekstrak alfalfa konsentrasi 6%
g	gram
GPx	<i>Glutathione Peroxidase</i>
GSH	<i>Glutathione</i>
H ₂ O ₂	Hidrogen peroksida
IC ₅₀	<i>Inhibitory Concentration 50%</i>
<i>in vitro</i>	Penelitian yang dilakukan di luar tubuh organisme
IVF	<i>In Vitro Fertilization</i>
kg	kilogram
KLT	Kromatografi Lapis Tipis
mL	mililiter
NaCl	Natrium Klorida

pH	<i>potential of hydrogen</i> (derajat keasaman)
RAL	Rancangan Acak Lengkap
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SM	Sebelum Masehi
SOD	<i>Superoxide Dismutase</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Spermatozoa merupakan sel reproduksi jantan yang berperan dalam membawa materi genetik untuk membuahi ovum dalam proses fertilisasi. Sel ini terbentuk melalui proses spermatogenesis yang kompleks dan memiliki fungsi penting dalam keberhasilan reproduksi (Muharani, dkk., 2025). Infertilitas merupakan gangguan pada sistem reproduksi yang dapat dialami baik oleh pria maupun wanita. Salah satu faktor pada pria yang berkontribusi terhadap infertilitas adalah penurunan kualitas spermatozoa, seperti rendahnya motilitas, viabilitas, maupun abnormalitas morfologi. Penurunan kualitas spermatozoa tersebut dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor, salah satunya adalah stres oksidatif (Ridhoila, dkk., 2017).

Fertilisasi *in vitro* (IVF) merupakan salah satu teknologi reproduksi berbantu yang terus berkembang dan digunakan untuk membantu mengatasi masalah infertilitas. Teknik ini dilakukan dengan mempertemukan spermatozoa dan ovum di luar tubuh dalam media kultur yang terkontrol sehingga proses pembuahan dapat berlangsung secara optimal. Sebelum dilakukan fertilisasi, gamet diberikan perlakuan tertentu untuk mendukung keberhasilan proses pembuahan. Selain berperan dalam penanganan infertilitas, IVF juga dimanfaatkan untuk meningkatkan efisiensi pemanfaatan spermatozoa dan ovum serta mendukung upaya pencegahan kelainan genetik tertentu pada keturunan (Dewi, dkk., 2019). Keberhasilan fertilisasi, baik secara alami maupun melalui IVF, sangat dipengaruhi

oleh kualitas spermatozoa yang digunakan. Spermatozoa yang berkualitas memiliki viabilitas tinggi, morfologi normal, dan motilitas progresif yang baik (Shari, 2022).

Kualitas spermatozoa merupakan salah satu faktor penting yang menentukan keberhasilan fertilisasi, baik secara alami maupun melalui fertilisasi in vitro (IVF). Spermatozoa yang berkualitas memiliki viabilitas tinggi, morfologi normal, dan motilitas progresif yang baik. Motilitas merupakan kemampuan spermatozoa untuk bergerak maju secara aktif dalam media cair, sehingga memungkinkan spermatozoa mencapai dan menembus lapisan pelindung ovum selama proses fertilisasi

Kualitas spermatozoa berkaitan erat dengan kondisi fisiologis tubuh, terutama keseimbangan antara produksi radikal bebas dan sistem antioksidan. Peningkatan kadar ROS yang tidak diimbangi oleh aktivitas antioksidan dapat memicu stres oksidatif, yang selanjutnya menyebabkan kerusakan pada sel spermatozoa (Kowalczyk, 2022). Stres oksidatif dapat memicu kerusakan membran plasma spermatozoa yang kaya akan asam lemak tak jenuh melalui proses peroksidasi lipid. Kondisi tersebut mengakibatkan penurunan fluiditas membran serta terganggunya fungsi mitokondria dalam memproduksi ATP. Berkurangnya produksi ATP kemudian berdampak pada menurunnya motilitas spermatozoa. Selain itu, ROS juga dapat memicu kerusakan DNA spermatozoa yang berpengaruh terhadap penurunan viabilitas dan kemampuan fertilisasi (Kaltsas *et al.*, 2026; Dutta *et al.*, 2019). Konsep keseimbangan ini dijelaskan dalam Al-Quran pada surah Al-Infithar ayat 6-8 sebagai berikut.

يَأْتِيهَا الْإِنْسَانُ مَا غَرَّكَ بِرَبِّكَ الْكَرِيمِ ٦ الَّذِي خَلَقَكَ فَسَوِّكَ فَعَدَلَكَ ٧ فِي أَيِّ صُورَةٍ مَا شَاءَ رَكَّبَكَ ٨

Artinya: “*Wahai manusia, apakah yang telah memperdayakanmu (berbuat durhaka) terhadap Tuhanmu Yang Maha Mulia, yang telah menciptakanmu lalu menyempurnakan kejadianmu dan menjadikan (susunan tubuh)-mu seimbang? Dalam bentuk apa saja yang dikehendaki, Dia menyusun (tubuh)-mu.*” (QS. Al-Infithar [82]: 6-8).

Makna kata (الَّذِي خَلَقَكَ) menurut Qurthubi dalam Tafsir Qurthubi yang diterjemahkan oleh Utsman (2009), berarti Allah yang mengatur penciptaanmu dari setetes mani, (فَسَوَّيَكَ) dalam perut ibumu, kemudian menjadikan bagimu memiliki dua tangan, dua kaki, sepasang mata, serta seluruh anggota tubuhmu. Adapun kata (فَعَدَّلَكَ) berarti menjadikanmu ciptaan yang lurus, sepadan dan seimbang. Lebih lanjut, Az-Zuhaili (2005) dalam Tafsir Al-Munir yang diterjemahkan oleh Kattani, dkk (2013), menjelaskan kata (فَسَوَّيَكَ) bahwa Allah telah menjadikan anggota tubuhmu lurus dan sesuai serta disiapkan dengan fungsi masing – masing. Adapun kata (فَعَدَّلَكَ) menunjukkan bahwa Allah menjadikan (susunan tubuh) mu seimbang dalam penciptaan. Allah menciptakanmu dari sperma setelah sebelumnya tidak ada, menjadikanmu sempurna, seimbang dalam rupa dan bentuk dengan anggota tubuh yang serasi, tidak bertentangan, ditambah dengan pancaindra berupa pendengaran, penglihatan, kemampuan akal dan pemahaman. Selain itu, Dia menciptakanmu dalam bentuk paling indah yang Dia kehendaki. Engkau tidak memilih bentuk dirimu sendiri.

Shihab (2002) pada *Tafsir Al-Mishbah*, menjelaskan bahwa kata (الكَرِيم) menunjukkan Allah Al-Karim adalah Dia Yang Maha Pemurah dengan pemberian-Nya, Maha Luas dengan anugerah-Nya, tidak terlampaui oleh harapan dan cita betapapun tinggi dan besarnya harapan dan cita. Dia yang memberi tanpa perhitungan. Sementara itu, kata (فَعَدَّلَكَ) berarti seimbang. Kata ini dapat berarti menjadikan anggota tubuh manusia seimbang, serasi sehingga tampak harmonis,

dapat juga berarti menjadikanmu memiliki kecenderungan untuk bersikap adil. Allah membentuk manusia dalam bentuk apapun yang dikehendaki-Nya antara lain dalam bentuk cantik atau buruk, gagah atau jelek, pria atau wanita, tinggi atau pendek. Alhasil, dalam bentuk apapun yang dikehendaki-Nya. Kehendak-Nya itu bisa wujud melalui sistem yang ditetapkan-Nya dan yang bila mampu diungkap oleh manusia maka ia dapat memanfaatkannya.

Perlindungan spermatozoa terhadap kerusakan akibat stres oksidatif dapat ditingkatkan oleh keberadaan senyawa antioksidan. Antioksidan berfungsi menekan aktivitas radikal bebas dengan cara menyumbangkan elektron, sehingga radikal tersebut menjadi lebih stabil dan tidak memicu reaksi berantai yang dapat merusak komponen sel. Peran antioksidan tidak terbatas pada pencegahan kerusakan spermatozoa akibat ROS, melainkan juga mencakup modulasi kadar ROS dalam plasma seminal untuk mempertahankan lingkungan fisiologis yang diperlukan bagi fungsi spermatozoa dan keberhasilan fertilisasi (Kaltsas *et al.*, 2026).

Bahan alam yang mampu mengatasi radikal bebas yang juga memiliki kandungan antioksidan diantaranya seperti alfalfa (*Medicago sativa* L.). Alfalfa berpotensi mempertahankan kualitas spermatozoa melalui aktivitas antioksidannya. Tanaman alfalfa (*Medicago sativa* L.) memiliki kandungan senyawa bioaktif dengan antioksidan tinggi. Alfalfa kaya akan senyawa fitokimia seperti flavonoid, saponin, vitamin dan mineral (Susilowati dan Rosyidah, 2008). Kandungan aktif yang dimiliki oleh alfalfa berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai antioksidan. Flavonoid pada umumnya lebih mudah larut dalam air maupun pelarut polar karena memiliki ikatan gugus gula pada strukturnya. Penggunaan pelarut etanol 70%

dalam proses ekstraksi mampu menarik senyawa polar dan semi polar tanpa merusak struktur aktifnya (Padmasari, dkk., 2013).

Beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan pengaruh flavonoid dan beberapa senyawa aktif yang sama seperti yang dimiliki oleh alfalfa berperan dalam menetralkan radikal bebas. Aktivitas antioksidan alfalfa telah dilaporkan oleh Widyowati dkk. (2014), yang menunjukkan bahwa ekstrak etanolik 70% tanaman tersebut memiliki nilai IC_{50} sebesar 59,339 $\mu\text{g/mL}$ serta mengandung senyawa flavonoid. Nilai IC_{50} digunakan sebagai indikator kekuatan aktivitas antioksidan suatu senyawa. Semakin rendah nilai IC_{50} yang diperoleh, semakin efektif senyawa tersebut dalam menghambat radikal bebas sehingga aktivitas antioksidannya semakin tinggi. Keberadaan flavonoid berperan dalam kemampuan alfalfa menangkal radikal bebas melalui aktivitas antioksidannya. Aktivitas antioksidan yang lebih kuat juga dilaporkan pada ekstrak *Capparis spinosa* dengan nilai IC_{50} sebesar 21,591 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrak tersebut mampu mempertahankan kualitas spermatozoa manusia dengan motilitas mencapai 51,8%, yang berkaitan dengan kandungan flavonoid sebagai senyawa antioksidan dominan (Rad *et al.*, 2021). Oleh karena itu, aktivitas antioksidan ekstrak etanol 70% alfalfa yang tergolong kuat menjadi dasar penggunaannya dalam penelitian ini untuk mengevaluasi pengaruhnya terhadap kualitas spermatozoa, khususnya motilitas dan viabilitas.

Temuan tersebut didukung dengan penelitian Leyn dkk. (2021) yang menemukan bahwa ekstrak kulit buah naga yang kaya flavonoid dan antosianin mampu menghambat radikal bebas hingga $83,48 \pm 5,03\%$. Senyawa flavonoid pada ekstrak tersebut diketahui berperan dalam melindungi spermatozoa dari kerusakan yang dipicu oleh stres oksidatif. Oleh karena itu, tanaman yang mengandung

senyawa antioksidan dalam jumlah tinggi berpotensi dimanfaatkan untuk membantu mempertahankan kualitas spermatozoa.

Flavonoid termasuk kelompok metabolit sekunder golongan fenolik yang diketahui memiliki kemampuan antioksidan dalam menangkal radikal bebas (Zuraida *et al.*, 2017). Senyawa ini termasuk kelas polifenol yang memiliki banyak gugus fenol dalam strukturnya, sehingga dapat menstabilkan senyawa radikal. Flavonoid akan berperan sebagai antioksidan dengan cara menangkap radikal bebas yang dilepaskan peroksida (Yuslianti, 2018; Sholihin dan Ducha, 2024). Kemampuan tersebut diperlukan oleh sel spermatozoa karena membrannya kaya akan asam lemak tak jenuh yang mudah mengalami peroksidasi lipid. Dengan adanya antioksidan diharapkan mampu melindungi protein spermatozoa dari oksidasi berlebihan, menjaga fungsi enzim mitokondria tetap optimal dalam menghasilkan ATP untuk pergerakan flagel, serta melindungi DNA spermatozoa dari fragmentasi akibat serangan ROS. Selain itu, antioksidan keberadaannya tidak hanya menetralkan ROS, tetapi juga mempertahankan integritas struktural dan fungsional sperma, sehingga kualitas spermatozoa dalam hal motilitas, viabilitas, dan tetap terjaga (Moretti *et al.*, 2023).

Mencit (*Mus musculus*) merupakan salah satu hewan laboratorium yang banyak digunakan dalam penelitian reproduksi karena memiliki siklus reproduksi yang relatif singkat, tingkat fertilitas yang tinggi, serta kesamaan fisiologis dengan manusia pada beberapa aspek biologis (Hickman *et al.*, 2016). Oleh karena itu, spermatozoa mencit dapat digunakan sebagai model untuk mengevaluasi pengaruh bahan alami yang berpotensi mendukung kualitas spermatozoa. Namun, penelitian mengenai pemanfaatan ekstrak etanol 70% alfalfa terhadap kualitas spermatozoa

Mus musculus secara *in vitro* masih tergolong terbatas. Selain itu, penelitian mengenai respons spermatozoa terhadap berbagai konsentrasi ekstrak alfalfa juga masih perlu dikaji lebih lanjut. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi pengaruh berbagai konsentrasi ekstrak etanol 70% alfalfa terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa *Mus musculus* secara *in vitro*.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah bagaimana pengaruh ekstrak etanol 70% alfalfa terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa *Mus musculus* secara *in vitro*?

1.3 Tujuan

Tujuan pada penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol 70% alfalfa terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa *Mus musculus* secara *in vitro*.

1.4 Manfaat

Manfaat pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Untuk memberikan informasi tentang pengaruh ekstrak etanol 70% alfalfa terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa *Mus musculus* secara *in vitro*.
2. Untuk memberikan alternatif pemanfaatan alfalfa sebagai antioksidan dalam mengatasi kesuburan reproduksi pada jantan.

1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Alfalfa yang digunakan adalah alfalfa kering dalam bentuk serbuk dan diekstraksi dengan pelarut etanol 70%.
2. Penelitian dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan spermatozoa mencit (*Mus musculus*) jantan dewasa yang diperoleh melalui isolasi organ reproduksi.

3. Konsentrasi ekstrak etanol 70% alfalfa yang dipaparkan dalam penelitian ini adalah konsentrasi 0%, 2%, 4% dan 6%, ekstrak tersebut diberikan pada spermatozoa yang diinkubasi pada waktu 0 menit dan 30 menit.
4. Parameter kualitas spermatozoa yang diamati adalah motilitas dan viabilitas. Metode yang digunakan pada parameter viabilitas adalah dengan pewarnaan eosin dan nigrosin untuk menilai vitalitas sperma. Sedangkan, parameter motilitas dilakukan dengan menggunakan mikroskop.
5. Media spermatozoa dalam penelitian ini menggunakan sodium chloride 0,9% infus.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alfalfa (*Medicago sativa* L.)

Alfalfa dikenal sebagai salah satu tanaman hijauan penting yang sering dijuluki sebagai “The Queen of Forage Crops” atau “Ratu Hijauan”. Tanaman ini termasuk salah satu spesies hijauan tertua yang berasal dari wilayah pegunungan Mediterania di Asia Barat Daya. Penyebaran alfalfa ke kawasan Eropa diperkirakan terjadi sekitar tahun 490 SM melalui bangsa Persia. Seiring perkembangannya, tanaman yang berasal dari daerah subtropis ini telah banyak dibudidayakan di berbagai negara, terutama sebagai sumber hijauan berkualitas untuk pakan ternak (Sajimin, 2011). Klasifikasi alfalfa (*Medicago sativa* L.) menurut Suherman (2009) adalah sebagai berikut.

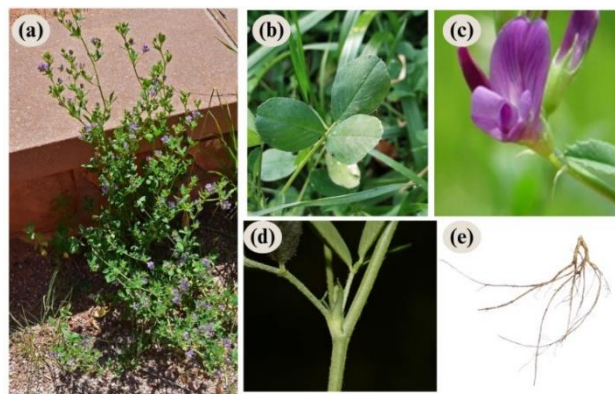
Kingdom	: Plantae
Division	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida
Order	: Fabales
Family	: Fabaceae
Genus	: <i>Medicago</i>
Species	: <i>Medicago sativa</i> L.

2.1.1 Morfologi

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) merupakan tanaman leguminosa perenial yang umum digunakan sebagai pakan ternak. Sistem perakaran tanaman ini berkembang hingga kedalaman 4,5 meter, yang memungkinkan tanaman tetap memperoleh air dan bertahan selama kondisi lingkungan yang mengalami kekeringan berkepanjangan (Sajimin, 2011). Menurut Al-Neem (2008), Alfalfa merupakan

tanaman herba tahunan yang memiliki akar tunggang dalam, bercabang, dan membentuk rimpang (*rhizome*) (Gambar 2.1e). Pertumbuhannya memerlukan paparan sinar matahari penuh serta kadar kapur tanah yang cukup. Tanaman ini dikenal tahan terhadap suhu tinggi dan mampu beradaptasi dengan baik pada kondisi penggembalaan yang berat. Secara morfologi, batang alfalfa dapat tumbuh mendatar hingga tegak dengan pangkal yang berkayu, dan tinggi tanaman mencapai 30–120 cm (Widyati-Slamet, dkk., 2014).

Selama fase pertumbuhannya, tanaman alfalfa membentuk beberapa jenis batang. Tunas aksilar yang terletak di bagian bawah ketiak daun akan berkembang menjadi batang utama yang tumbuh tegak setelah terbentuknya mahkota tanaman, sedangkan tunas aksilar yang muncul di atas permukaan tanah akan membentuk cabang-cabang baru (Bora & Sharma, 2011). Mahkota memiliki aktivitas meristematik yang tinggi dengan menghasilkan tunas baru yang kemudian berkembang menjadi batang. Batang utama dapat mencapai panjang sekitar 1 meter setelah terbentuknya mahkota (Gambar 2.1d) (Bagavathiannan dan Van Acker, 2009). Setiap mahkota bahkan mampu menghasilkan 5-25 batang (Doss *et al.*, 2011).



Gambar 2.1 Morfologi *Medicago sativa* L. (a) Alfalfa, (b) Daun, (c) Bunga, (d) Batang, dan (e) Akar (iNaturalis, 2025; Native Plant Trust, 2025).

Daun alfalfa memiliki bentuk trifoliat pada setiap tangkainya (Gambar 2.1b). Bentuk daunnya obovate-oblong hingga oval dengan tepi bergerigi halus. Ukuran daun berkisar antara 10–45 mm panjangnya dan 3–10 mm lebarnya. Bagian bawah daun dan tangkai daun alfalfa ditutupi oleh rambut-rambut halus yang disebut trikoma (Doss *et al.*, 2011). Susunan bunga alfalfa berbentuk tandan atau raceme yang tumbuh di ketiak daun. Dalam satu tandan dapat ditemukan sekitar 10–35 kuntum bunga (Widyati-Slamet *et al.*, 2014). Kelopak bunga berbentuk tabung (Gambar 2.1c), sedangkan mahkotanya dapat berwarna kuning, biru, atau ungu dengan panjang sekitar 6–15 mm (Bora & Sharma, 2011). Biji alfalfa berukuran kecil, berwarna cokelat, dan memiliki bentuk menyerupai ginjal dengan diameter sekitar 1–2 mm (Doss *et al.*, 2011).

2.1.2 Kandungan dan Manfaat

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) merupakan tanaman herbal yang memiliki kandungan gizi yang tinggi, seperti protein, vitamin, dan mineral, sehingga banyak dimanfaatkan untuk menunjang kesehatan. Kecambah alfalfa umumnya dikonsumsi sebagai bahan pangan, khususnya dalam salad. Sementara itu, bagian daun, batang, akar, dan biji tanaman alfalfa dapat diformulasikan menjadi berbagai sediaan suplemen kesehatan, antara lain bubuk herbal, kapsul, dan tablet (Gomathi *et al.*, 2016). Selain sebagai sumber nutrisi, daun dan batang alfalfa juga telah dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional maupun modern. Berbagai penelitian melaporkan bahwa alfalfa memiliki aktivitas antibakteri, berpotensi meningkatkan produksi air susu ibu sebagai galaktagog, serta dapat digunakan sebagai tonik untuk membantu menjaga fungsi sistem pencernaan. Selain itu, senyawa antioksidan yang

terdapat pada alfalfa berfungsi sebagai penangkal radikal bebas sehingga mampu mengurangi kerusakan oksidatif pada sel (Hanif *et al.*, 2015).

Tanaman Alfalfa (*Medicago sativa* L.) ditumbuhkan oleh Allah untuk dimanfaatkan untuk memenuhi kebutuhan makhluk-Nya. Hal ini dijelaskan dalam Al-Qur'an Surah Asy-Syu'ara' ayat 7 sebagai berikut.

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ۝٧

Artinya: “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam (tumbuh-tumbuhan) yang baik?” (QS. Asy-Syu'ara' [26]: 7).

Menurut Qurthubi dalam *Tafsir Qurthubi* yang diterjemahkan oleh Utsman (2009), ayat tersebut menjelaskan bahwa Allah telah memperingatkan akan keagungan dan kekuasaan-Nya, bahwa jika mereka melihat dengan hati dan mata, mereka niscaya akan mengetahui bahwa Allah adalah yang berhak untuk disembah, karena Maha Kuasa atas segala sesuatu. Shiddieqy (1961) dalam *Tafsir An-Nuur* yang diterjemahkan oleh Shiddiqi, dkk (2000) juga menjelaskan apakah mereka terus-menerus mengingkari Allah, mendustakan Rasul-Nya, tidak mau memahami tanda-tanda kebesaran Allah yang ada di alam ini. Misalnya, bagaimana Allah menumbuhkan berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang beraneka ragam, yang semuanya menunjuk kepada keagungan Allah dan kekuasaan-Nya.

Makna kata (كُلِّ) menurut Az-Zuhaili (2005) dalam *Tafsir Al-Munir* yang diterjemahkan oleh Kattani, dkk (2013) berarti berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang menyeluruh, sedangkan kata (كَمْ) berarti menyeluruh dan banyak sekali. Artinya, telah Allah ciptakan dan tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan dan buah-buahan yang banyak manfaatnya. Maka dengan hal itu, manusia mendapatkan bukti keagungan kuasa Allah dan dahsyatnya kekuasaan-

Nya, bahwa Allah ada dan Esa lagi Mahakuasa terhadap segala sesuatu untuk memberikan petunjuk kepada kaum dan yang lainnya.

Hal ini juga selaras dengan firman Allah dalam Al-Qur'an Surah Luqman ayat 10 sebagai berikut.

خَلَقَ السَّمُوتَ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوُهَا وَالْقَى فِي الْأَرْضِ رَوَاسِيَ أَنْ تَمِيدَ بِكُمْ وَبَثَّ فِيهَا مِنْ كُلِّ دَابَّةٍ وَأَنْزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ١٠

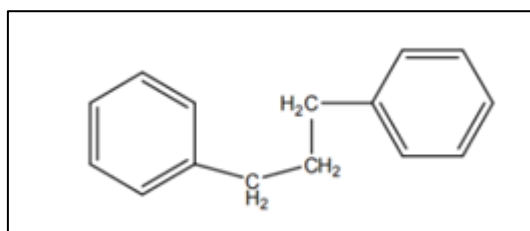
Artinya: “Dia menciptakan langit tanpa tiang (seperti) yang kamu lihat dan meletakkan di bumi gunung-gunung (yang kukuh) agar ia tidak mengguncangkanmu serta menyebarkan padanya (bumi) segala jenis makhluk bergerak. Kami (juga) menurunkan air hujan dari langit, lalu Kami menumbuhkan padanya segala pasangan yang baik.” (QS. Luqman [31]: 10).

Menurut Az-Zuhaili (2005) dalam *Tafsir Al-Munir* yang diterjemahkan oleh Kattani, dkk (2013), ayat tersebut menjelaskan bahwa Allah menuturkan dalil dan bukti-bukti petunjuk atas kuasa-Nya yang agung, yaitu penciptaan langit dan bumi berikut segala apa yang ada di antara keduanya untuk mengukuhkan dan menegaskan keesaan-Nya dan kebatilan syirik, serta menegaskan keharusan mengikuti yang haq yang dibawa oleh para rasul.

Lebih lanjut, Shiddieqy (1961) dalam *Tafsir An-Nur* yang diterjemahkan oleh Shiddiqi, dkk (2000) menjelaskan bahwa Allah telah menurunkan hujan dari awan, maka menjadilah hujan itu sebagai penyebab tumbuhnya berbagai macam tanaman yang mempunyai warna yang indah dan manfaat yang banyak. Makna kata (مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ) menurut Thabari dalam *Tafsir Ath-Thabari* yang diterjemahkan oleh Al Bakri, dkk (2007) adalah segala macam tumbuh-tumbuhan yang baik, dari setiap jenis tumbuh-tumbuhan yang (كَرِيمٍ) baik pertumbuhannya.

Berbagai manfaat kesehatan alfalfa (*Medicago sativa* L.) didukung oleh kandungan senyawa bioaktif yang dimilikinya, antara lain saponin, flavonoid,

fitoestrogen, kumarin, alkaloid, terpenoid, asam amino, fitosterol, serta vitamin (Darni & Gizi, 2018). Senyawa-senyawa tersebut memiliki aktivitas antioksidan melalui berbagai mekanisme, antara lain dengan menangkal radikal bebas, menghambat proses peroksidasi lipid, serta meningkatkan kerja enzim antioksidan endogen seperti *superoxide dismutase* (SOD), *catalase* (CAT), dan *glutathione peroxidase* (GPx) (Wang *et al.*, 2018). Di antara berbagai senyawa bioaktif yang terkandung dalam alfalfa, flavonoid merupakan salah satu kelompok yang banyak dilaporkan berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan. Berdasarkan karakteristik struktur kimianya, flavonoid dikelompokkan menjadi beberapa jenis, meliputi flavonol, flavan-3-ol, flavanon, antosianin, dan isoflavon (Widiasrini, dkk., 2024). Keberadaan berbagai senyawa bioaktif tersebut diduga menjadi dasar dari beragam aktivitas biologis alfalfa. Gomathi *et al.* (2016) menjelaskan bahwa ekstrak yang berasal dari kecambah, daun, maupun akar alfalfa berpotensi menurunkan kadar kolesterol pada hewan percobaan maupun manusia.



Gambar 2.2 Struktur dasar flavonoid (Widiasrini, dkk., 2024).

Flavonoid merupakan senyawa dengan struktur dasar berupa cincin aromatik yang saling terhubung melalui tiga atom karbon sebagai penghubung. Pengelompokan senyawa ini dapat didasarkan pada reaksi warna yang dihasilkan akibat adanya gugus hidroksil fenolik serta struktur cincin piron (Gambar 2.2.). Flavonoid termasuk dalam kelompok metabolit sekunder serta merupakan bagian dari senyawa fenol, yaitu senyawa yang memiliki cincin benzena dengan gugus hidroksil ($-OH$) yang dapat mengalami substitusi (Ningsih *et al.*, 2023).

Penelitian yang dilakukan oleh Widyowati dkk. (2014) mengungkapkan bahwa alfalfa (*Medicago sativa* L.) mengandung flavonoid dan vitamin C yang berperan sebagai sumber antioksidan alami. Aktivitas antioksidan ekstrak diuji menggunakan metode DPPH, yang mengamati kemampuan senyawa antioksidan dalam menetralkan radikal bebas melalui donasi atom hidrogen. Reaksi tersebut ditunjukkan dengan perubahan warna larutan DPPH dari ungu menjadi kuning. Tingkat aktivitas antioksidan dinyatakan dengan nilai IC_{50} , yaitu konsentrasi yang mampu menghambat 50% radikal bebas. Semakin kecil nilai IC_{50} yang diperoleh, semakin kuat aktivitas antioksidan ekstrak tersebut. Ekstrak etanol herba alfalfa memiliki nilai IC_{50} sebesar 59,339 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan vitamin C sebagai kontrol positif memiliki nilai IC_{50} sebesar 4,768 $\mu\text{g/mL}$. Hasil identifikasi menggunakan KLT juga menunjukkan adanya flavonoid yang ditandai dengan munculnya warna kuning pada bercak ekstrak. Temuan tersebut, dapat menunjukkan bahwa ekstrak etanol herba alfalfa memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dan berpotensi dimanfaatkan sebagai sumber antioksidan alami untuk membantu melindungi sel dari kerusakan akibat stres oksidatif.

Penelitian Darni dkk. (2016) juga menunjukkan bahwa ekstrak daun alfalfa (*Medicago sativa* L.) memiliki aktivitas antioksidan yang efektif dalam mengurangi stres oksidatif. Kandungan flavonoid pada daun alfalfa diduga berperan penting dalam fungsi ini melalui peningkatan aktivitas enzim lipoprotein lipase dan kemampuan menangkap radikal bebas. Hasil penelitian ini mendukung bahwa alfalfa memiliki potensi biologis sebagai sumber antioksidan alami yang dapat menjaga kestabilan sel terhadap kerusakan oksidatif.

2.2 *Mus musculus*

Mencit (*Mus musculus*) merupakan salah satu hewan laboratorium yang paling banyak digunakan dalam penelitian biomedis, termasuk penelitian di bidang reproduksi. Hal ini disebabkan oleh beberapa keunggulan, seperti siklus reproduksi yang relatif singkat, kemudahan pemeliharaan, serta kesamaan fisiologis dengan manusia pada beberapa aspek biologis. Selain itu, mencit memiliki tingkat fertilitas yang tinggi sehingga memudahkan ketersediaan sampel dalam jumlah yang memadai untuk penelitian (Hickman *et al.*, 2016). Klasifikasi mencit menurut Nugroho (2018) adalah sebagai berikut.

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Genus	: Mus
Spesies	: <i>Mus musculus</i> (Linnaeus, 1753)

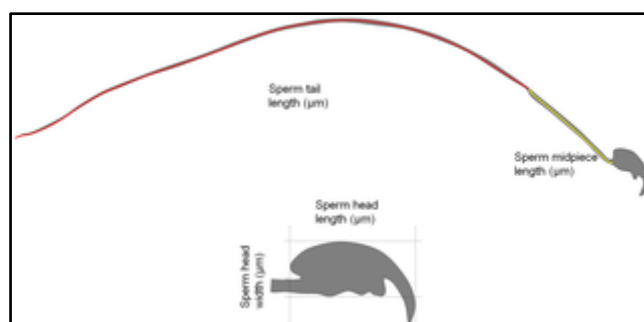
2.2.1 Sistem Reproduksi Mencit

Sistem reproduksi jantan merupakan sistem organ yang berperan dalam proses reproduksi melalui produksi hormon, pembentukan sel kelamin jantan (spermatozoa), serta transportasi spermatozoa hingga terjadi fertilisasi. Sistem ini terdiri atas testis, duktus eferen epididimis, dan vas deferens yang bekerja sama untuk menunjang fungsi reproduksi. Mencit jantan umumnya mencapai fase kematangan seksual pada usia sekitar 10 hingga 12 minggu (Huang *et al.*, 2022).

Testis berperan sebagai tempat berlangsungnya spermatogenesis sekaligus penghasil hormon testosteron. Setelah terbentuk, spermatozoa akan ditransportasikan melalui duktus eferen menuju epididimis untuk menjalani proses pematangan. Selama berada di epididimis, spermatozoa memperoleh kemampuan bergerak (motilitas) dan kapasitas membuahi ovum. Spermatozoa yang telah matang selanjutnya disimpan, terutama pada bagian kauda epididimis, sebelum dikeluarkan melalui vas deferens saat ejakulasi (Iqra, dkk., 2023).

2.2.2 Spermatozoa

Spermatozoa merupakan gamet jantan yang telah berdiferensiasi sempurna sehingga tidak memiliki kemampuan untuk mengalami pertumbuhan maupun pembelahan sel. Struktur spermatozoa tersusun atas tiga bagian utama, yaitu kepala, leher, dan ekor, yang masing – masing memiliki fungsi dalam menunjang proses fertilisasi (Gambar 2.4). Pada mamalia, panjang spermatozoa umumnya berada pada kisaran 55 - 65 μ m, meskipun ukuran tersebut dapat berbeda antar spesies. Spermatozoa pada mencit (*Mus musculus*) memiliki karakteristik berupa kepala berbentuk melengkung menyerupai kait yang membedakan dari beberapa spesies mamalia lainnya (Iqra, dkk., 2023).



Gambar 2. 3 Struktur spermatozoa *Mus musculus* (Albrechtová *et al.*, 2014).

Kepala spermatozoa berisi nukleus yang menyimpan informasi genetik dari pejantan. Pada bagian anterior kepala terdapat akrosom, yaitu struktur yang berasal

dari aparatus Golgi dan mengandung berbagai enzim hidrolitik yang berperan dalam membantu spermatozoa menembus lapisan pelindung ovum selama proses pembuahan. Di belakang kepala terdapat bagian leher atau midpiece yang kaya akan mitokondria tersusun spiral. Mitokondria tersebut menghasilkan energi dalam bentuk adenosin trifosfat (ATP) yang diperlukan untuk mendukung aktivitas pergerakan spermatozoa. Adapun bagian ekor (flagellum) berfungsi sebagai alat gerak yang memungkinkan spermatozoa berenang menuju sel telur secara progresif (Albrechtová *et al.*, 2014).

Motilitas merupakan salah satu indikator penting dalam evaluasi kualitas sperma karena berhubungan langsung dengan kemampuan spermatozoa mencapai dan membuahi ovum. Oleh karena itu, pengamatan motilitas sering digunakan untuk menilai potensi fertilitas spermatozoa. Kemampuan bergerak tersebut sangat bergantung pada ketersediaan energi yang dihasilkan oleh mitokondria pada bagian midpiece dan digunakan untuk menggerakkan ekor spermatozoa (Yumte *et al.*, 2013). Motilitas spermatozoa dapat dinilai melalui motilitas massa maupun motilitas individu. Motilitas massa menggambarkan pergerakan spermatozoa secara bersama-sama yang tampak sebagai gelombang, sedangkan motilitas individu menunjukkan pola pergerakan masing-masing spermatozoa. Spermatozoa yang bergerak maju secara aktif dan terarah menunjukkan motilitas yang baik, sementara gerakan memutar, bergerak mundur, atau berputar di tempat termasuk gerakan abnormal yang dapat mengindikasikan penurunan kualitas spermatozoa. Spermatozoa yang tidak menunjukkan pergerakan dikategorikan sebagai sel mati (Triyani *et al.*, 2024).

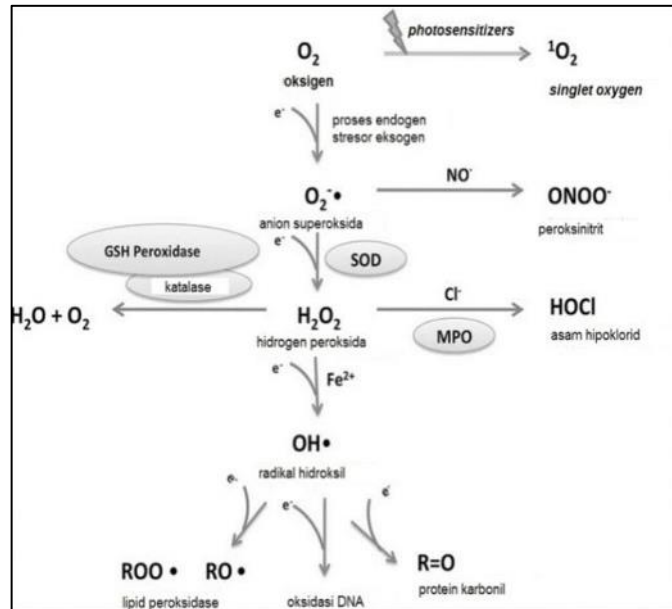
Viabilitas spermatozoa menggambarkan kemampuan spermatozoa untuk tetap hidup serta mempertahankan aktivitas fisiologisnya dalam kondisi lingkungan tertentu. Spermatozoa yang masih hidup memiliki membran plasma yang utuh dan bersifat semipermeabel, sehingga zat warna tidak dapat menembus sel dan spermatozoa tampak transparan saat diamati. Sebaliknya, pada spermatozoa yang telah mati, membran plasma mengalami kerusakan yang menyebabkan peningkatan permeabilitas sel. Akibatnya, zat warna dapat masuk dan terserap ke dalam sel sehingga spermatozoa tampak berwarna pada saat pengamatan mikroskopis (Indriyani *et al.*, 2021).

Kualitas spermatozoa dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor, baik yang berasal dari kondisi fisiologis maupun lingkungan. Salah satu penyebab utama penurunan kualitas spermatozoa adalah stres oksidatif, yaitu keadaan ketika jumlah Reactive Oxygen Species (ROS) yang terbentuk melebihi kapasitas sistem antioksidan dalam menetralsirnya. Ketidakseimbangan tersebut dapat mengakibatkan kerusakan komponen sel spermatozoa sehingga menurunkan kualitasnya. Sejumlah faktor lingkungan diketahui berperan dalam meningkatkan produksi ROS pada semen yang pada akhirnya dapat menyebabkan gangguan fertilitas. Paparan gelombang elektromagnetik yang berasal dari perangkat elektronik, seperti telepon seluler dan gawai, dilaporkan mampu menurunkan konsentrasi, motilitas, dan viabilitas spermatozoa baik pada penelitian *in vitro* maupun *in vivo* (Kim *et al.*, 2021). Selain itu, berbagai polutan lingkungan, termasuk pestisida, logam berat, dan limbah industri, juga dapat memicu kerusakan spermatozoa melalui peningkatan fragmentasi DNA serta perubahan morfologi sel (Jurewicz *et al.*, 2018).

Faktor gaya hidup juga berkontribusi terhadap peningkatan stres oksidatif yang berdampak pada kualitas spermatozoa. Obesitas diketahui dapat mengganggu keseimbangan hormon reproduksi melalui penurunan kadar testosteron, peningkatan kadar estrogen, serta akumulasi jaringan adiposa yang berkaitan dengan peningkatan produksi ROS (Furukawa *et al.*, 2017). Kebiasaan merokok dapat memicu leukositospermia yang meningkatkan pembentukan ROS, sedangkan konsumsi alkohol berlebihan berpotensi menghambat proses spermatogenesis dan menurunkan kualitas sperma. Sebaliknya, penerapan pola makan yang kaya akan antioksidan, seperti diet Mediterania, dilaporkan dapat membantu memperbaiki kualitas semen serta memberikan perlindungan terhadap kerusakan oksidatif pada spermatozoa (Montjean *et al.*, 2023; Muthusami & Chinnaswamy, 2005).

2.3 Radikal Bebas dan Antioksidan

Radikal bebas atau ROS adalah molekul atau senyawa yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada kulit elektron terluarnya. Kondisi tersebut menyebabkan molekul ini menjadi tidak stabil dan cenderung bereaksi dengan cara mengambil elektron dari biomolekul lainnya, seperti lipid, protein, maupun DNA. Reaksi berantai yang terjadi dapat menimbulkan kerusakan sel dan berkontribusi terhadap terjadinya stres oksidatif (Erviana, dkk., 2016).



Gambar 2. 4 Pembentukan ROS (Chen, 2012)

Reactive Oxygen Species (ROS) terdiri atas beberapa bentuk, antara lain singlet oxygen (1O_2), anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan radikal hidroksil ($OH^{\cdot}$) (Gambar 2.4). Singlet oxygen merupakan molekul oksigen yang memiliki elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya sehingga memiliki tingkat energi yang lebih tinggi dan bersifat lebih reaktif. Energi tersebut dapat ditransfer ke molekul organik di sekitarnya atau memicu pembentukan spesies oksigen reaktif lainnya. Anion superoksida terbentuk melalui penambahan satu elektron pada molekul oksigen. Selanjutnya, anion superoksida dapat mengalami reaksi lanjutan membentuk hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida memiliki waktu hidup yang relatif lebih lama dibandingkan jenis ROS lainnya, sehingga berpotensi menimbulkan kerusakan sel (Andarina dan Djauhari, 2017). Apabila hidrogen peroksida mengalami reduksi lebih lanjut melalui penambahan elektron, dapat terbentuk radikal hidroksil. Meskipun memiliki waktu hidup yang sangat singkat, radikal hidroksil merupakan salah satu ROS yang paling reaktif dan memiliki kemampuan oksidatif yang sangat tinggi (Chen, 2012).

ROS dapat terbentuk baik secara endogen (fisiologis) maupun eksogen. Secara endogen, ROS dihasilkan sebagai bagian dari proses metabolisme normal tubuh. ROS ini berasal dari sumber enzimatik maupun non enzimatik. Sumber enzimatik ROS endogen terutama berasal dari proses metabolisme oksigen di mitokondria, seperti mitokondria oksidase, monoamin oksidase, mieloperoksidase, xantin oksidase, serta nitric oxide synthase (Noori, 2011). Pada metabolisme oksidatif di mitokondria, glukosa dipecah menjadi adenosin trifosfat (ATP) dan air. Namun, sebagai produk samping, sebagian oksigen dapat direduksi menjadi anion superoksida yang termasuk ROS yang sangat reaktif. Diperkirakan sekitar 1–2% oksigen yang digunakan dalam sel akan berubah menjadi anion superoksida (Chen, 2012).

Selain dari proses pembentukan ATP, ROS juga dapat dihasilkan oleh aktivitas xantin oksidase yang berperan dalam degradasi nukleotida purin, yaitu mengubah hipoksantin menjadi xantin, kemudian menjadi asam urat, serta melibatkan nitric oxide synthase dalam produksi nitrit oksida. Proses-proses tersebut dapat menghasilkan anion superoksida dalam jumlah cukup besar, yang selanjutnya akan dikonversi secara spontan oleh enzim superoksida dismutase (SOD) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) (Andarina dan Djauhari, 2017).

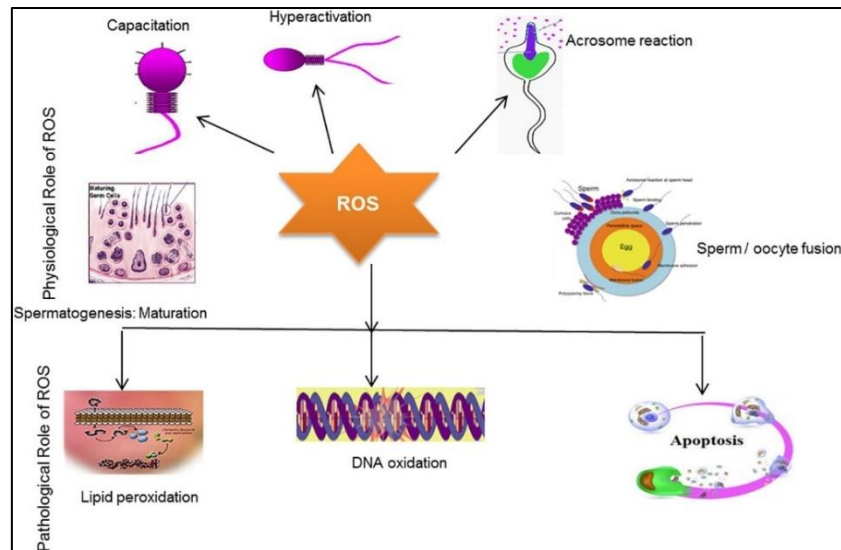
Salah satu sumber ROS endogen nonenzimatik adalah hidrogen peroksida (H_2O_2), yang berperan penting dalam reaksi Fenton. Pada reaksi ini, H_2O_2 bereaksi dengan ion logam seperti besi atau tembaga sehingga menghasilkan radikal hidroksil ($OH\bullet$), yaitu salah satu jenis ROS yang sangat reaktif dan tidak stabil (Noori, 2012). Selain berasal dari dalam tubuh, ROS juga dapat terbentuk akibat faktor eksogen yang berasal dari lingkungan, seperti radiasi ultraviolet (UV),

penggunaan obat-obatan tertentu, polusi udara, dan asap rokok. Pembentukan ROS paling banyak dipicu oleh paparan sinar UVA. Ketika sinar UVA menembus kulit, energi foton akan diserap oleh molekul kromofor atau fotosensitiser dalam sel, seperti sitokrom, riboflavin, heme, dan porfirin. Penyerapan energi tersebut memicu transfer energi ke molekul oksigen sehingga terbentuk singlet oxygen dan berbagai jenis ROS lainnya. Selain itu, polutan lingkungan seperti hidrokarbon aromatik polisiklik dapat mengalami transformasi menjadi ROS melalui perantara senyawa quinon (Chen, 2012).

Kondisi stres oksidatif ditandai dengan meningkatnya produksi *reactive oxygen species* (ROS) yang tidak sebanding dengan kemampuan sistem antioksidan dalam menyeimbangkan keadaan oksidatif di dalam sel. ROS adalah kelompok molekul reaktif yang terbentuk selama proses metabolisme normal maupun akibat paparan faktor eksternal tertentu. Apabila jumlahnya meningkat secara berlebihan, ROS dapat merusak berbagai komponen sel, termasuk membran, protein, dan materi genetik (Rahmadiani, dkk., 2023).

Spermatozoa termasuk sel yang secara fisiologis dapat menghasilkan ROS dalam jumlah tertentu. Akan tetapi, peningkatan ROS yang tidak terkendali dapat memicu oxidative stress dan menyebabkan gangguan pada struktur maupun fungsi spermatozoa. Kerentanan sel ini terhadap stres oksidatif dipengaruhi oleh rendahnya kandungan sitoplasma serta terbatasnya mekanisme pertahanan antioksidan yang dimilikinya (Thompson *et al.*, 2013). Selain itu, membran plasma spermatozoa memiliki kandungan asam lemak tak jenuh ganda yang tinggi sehingga mudah mengalami peroksidasi lipid. Kerusakan lipid membran tersebut

dapat mengubah stabilitas dan integritas membran sel sehingga berdampak pada penurunan fungsi spermatozoa (Gambar 2.4) (Prasetyo, 2014).

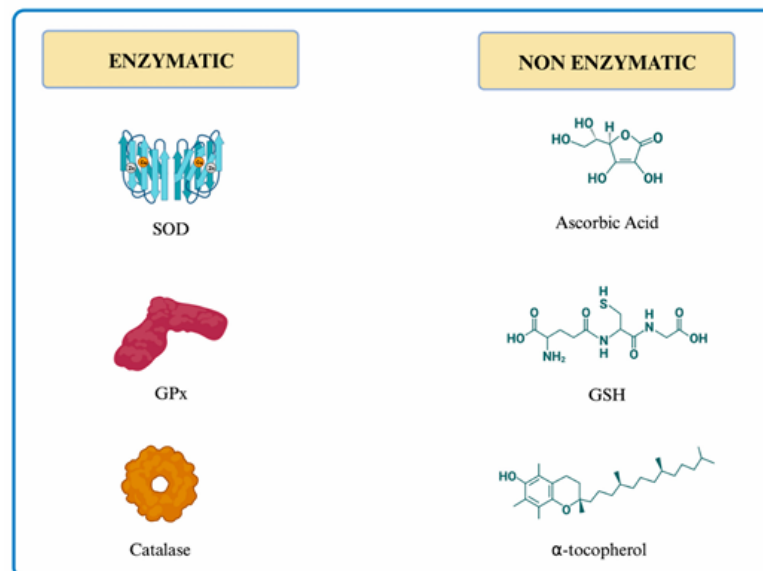


Gambar 2.5 Peran ROS dalam proses fisiologis dan patologis spermatozoa (Hussain *et al.*, 2023).

Mekanisme kerja antioksidan adalah dengan menyumbangkan elektron kepada radikal bebas sehingga senyawa tersebut menjadi stabil dan tidak lagi bersifat sangat reaktif. Tubuh memang memiliki sistem antioksidan endogen sebagai mekanisme pertahanan terhadap stres oksidatif, namun kapasitasnya sering kali tidak mencukupi ketika produksi radikal bebas meningkat akibat proses metabolisme maupun pengaruh lingkungan. Oleh karena itu, diperlukan tambahan antioksidan dari luar tubuh diperlukan untuk membantu menjaga keseimbangan oksidatif. Sumber antioksidan eksogen dapat diperoleh dari berbagai bahan pangan maupun tanaman yang mengandung senyawa antioksidan alami (Wahdaniah *et al.*, 2020). Mekanisme kerja antioksidan meliputi menunda dan mencegah kerusakan oksidatif, menghilangkan radikal bebas, mengikat logam, menurunkan aktivitas enzim pembentuk radikal bebas, serta menstimulasi enzim antioksidan internal (Procházková, *et al.*, 2011).

Flavonoid adalah senyawa antioksidan yang berperan dalam menghambat aktivitas radikal bebas baik secara langsung maupun tidak langsung. Secara alami, tubuh memiliki sistem pertahanan terhadap reactive oxygen species (ROS) yang terdiri atas antioksidan enzimatik dan nonenzimatik (Gambar 2.5). Antioksidan enzimatik bekerja secara terintegrasi untuk mengubah ROS menjadi senyawa yang lebih stabil dan tidak berbahaya. Enzim utama yang berperan dalam mekanisme tersebut adalah superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), dan glutathione peroxidase (GPx) (Kowalczyk, 2022).

SOD berfungsi mengubah radikal superoksida menjadi hidrogen peroksida dan oksigen. Hidrogen peroksida yang terbentuk kemudian dinetralkan oleh CAT menjadi air dan oksigen, sedangkan GPx mereduksi hidrogen peroksida maupun hidroperoksida lipid dengan bantuan glutathione (GSH) sebagai donor elektron (Fraczek & Kurpisz, 2005). Kerja sama ketiga enzim tersebut berperan penting dalam menjaga keseimbangan redoks sel serta melindungi spermatozoa dari kerusakan akibat stres oksidatif. Gangguan pada sistem antioksidan ini dapat meningkatkan peroksidasi lipid membran dan menurunkan kualitas spermatozoa, termasuk motilitas dan viabilitasnya (Kowalczyk, 2022).



Gambar 2.6 Klasifikasi antioksidan utama menjadi enzimatis dan non-enzimatis (Bansal, 2014).

Selain antioksidan enzimatis, tubuh juga memiliki sistem pertahanan berupa antioksidan non-enzimatis yang berfungsi membantu menetralkan reactive oxygen species (ROS) serta mempertahankan keseimbangan redoks di dalam sel. Antioksidan dalam kelompok ini umumnya berupa molekul kecil yang berperan sebagai donor elektron bagi radikal bebas, sehingga dapat mengurangi potensi kerusakan oksidatif pada lipid, protein, dan DNA. Senyawa yang termasuk antioksidan non-enzimatis antara lain vitamin E, vitamin C, glutathione (GSH), karotenoid, serta asam urat. Vitamin E berperan dalam melindungi membran sel dari kerusakan akibat peroksidasi lipid melalui kemampuannya menghentikan reaksi berantai radikal bebas. Sementara itu, vitamin C berfungsi sebagai antioksidan larut air yang dapat mereduksi ROS secara langsung serta membantu meregenerasi vitamin E ke bentuk aktifnya (Walczak–Jedrzejowska *et al.*, 2013).

Sebagai antioksidan endogen, glutathione (GSH) berfungsi penting dalam mempertahankan keseimbangan redoks sel dan berperan dalam detoksifikasi peroksida bersama enzim *glutathione peroxidase* (GPx). Selain GSH, karotenoid

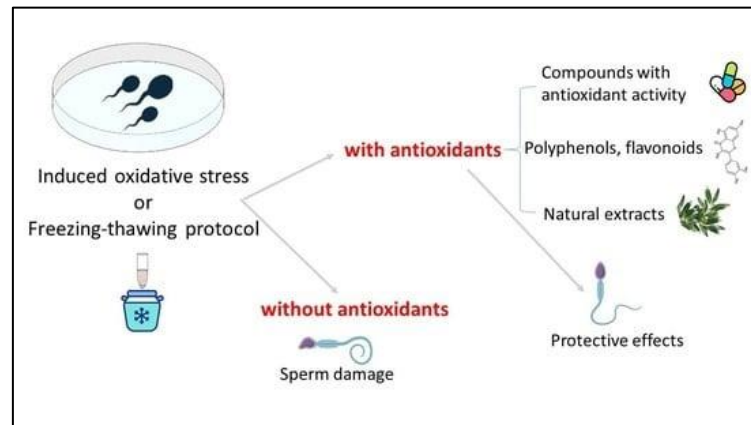
memiliki aktivitas antioksidan dengan menetralkan spesies oksigen reaktif, sedangkan asam urat berfungsi sebagai penangkap radikal bebas dalam plasma. Secara keseluruhan, antioksidan enzimatik dan non-enzimatik bekerja secara sinergis untuk mengendalikan kadar ROS dan melindungi sel dari kerusakan oksidatif. Gangguan keseimbangan antara pembentukan ROS dan kapasitas sistem antioksidan dapat memicu stres oksidatif yang berdampak negatif terhadap kualitas serta fungsi spermatozoa (Kowalczyk, 2022).

2.4 Pengaruh Ekstrak Alfalfa (*Medicago sativa* L.) terhadap Kualitas spermatozoa

Spermatozoa merupakan sel yang sangat terdiferensiasi dan menghasilkan *reactive oxygen species* (ROS) sebagai hasil metabolisme aerob. ROS dalam kadar rendah memiliki fungsi penting dalam jalur transduksi sinyal dan proses fisiologis seluler, seperti motilitas sperma, kapasitasi, reaksi akrosom, serta interaksi dengan oosit. Namun, ketika produksi ROS berlebihan atau sistem antioksidan tubuh tidak mampu berfungsi optimal, keseimbangan antara proses oksidasi dan reduksi menjadi terganggu sehingga memicu terjadinya stres oksidatif. Produksi ROS yang berlebihan disertai ketidakseimbangan sistem antioksidan dapat merusak struktur seluler terutama membran plasma yang kaya akan asam lemak tak jenuh ganda (*polyunsaturated fatty acids*/PUFA), serta molekul penting seperti DNA dan protein (Moretti *et al.*, 2023).

Sel spermatozoa sangat rentan terhadap kondisi tersebut karena memiliki kadar enzim antioksidan yang rendah serta kandungan sitoplasma yang sangat sedikit, sehingga kemampuan untuk menetralkan ROS dalam jumlah tinggi menjadi terbatas (Kowalczyk, 2022). Oleh karena itu, dibutuhkan antioksidan yang cukup

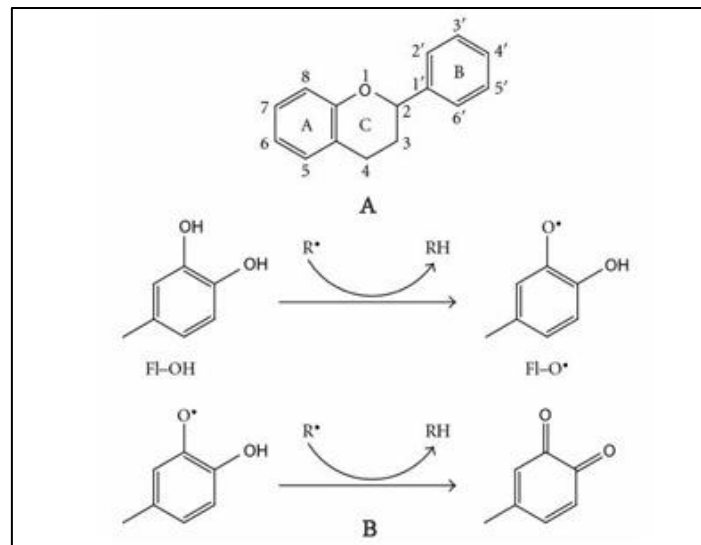
dalam menangani terjadinya stress oksidatif pada spermatozoa (Gambar 2.6.), salah satu diantaranya adalah dengan penambahan tanaman yang kaya antioksidan seperti Alfalfa.



Gambar 2. 7 Mekanisme antioksidan terhadap stress oksidatif (Moretti *et al.*, 2023).

Susilowati dan Rosyidah (2008) menyatakan bahwa flavonoid termasuk salah satu komponen utama yang terkandung dalam ekstrak etanol alfalfa. Senyawa ini termasuk kelompok polifenol yang memiliki kemampuan untuk mengurangi dampak stres oksidatif melalui aktivitas antioksidan. Hal tersebut disebabkan oleh kemampuan flavonoid dalam menekan pembentukan radikal bebas, menstabilkan spesies reaktif yang telah terbentuk, serta mendukung sistem pertahanan antioksidan alami tubuh. Menurut Procházková *et al.* (2011), aktivitas antioksidan flavonoid berkaitan dengan kemampuannya berinteraksi dengan reactive oxygen species (ROS) melalui mekanisme donor hidrogen maupun transfer elektron sehingga reaksi berantai oksidatif dapat dihentikan (Gambar 2.7). Selain berperan sebagai penangkap radikal bebas, flavonoid juga dapat berfungsi sebagai pengkelat logam (metal chelator). Kemampuan tersebut memungkinkan flavonoid mengikat ion logam transisi, seperti Fe^{2+} dan Cu^{2+} , yang diketahui terlibat dalam pembentukan ROS. Dengan demikian, keberadaan ion logam yang berpotensi memicu reaksi oksidatif dapat ditekan. Salah satu flavonoid yang diketahui

memiliki kemampuan pengkelatan logam yang baik adalah kuersetin (Liu *et al.*, 2010).



Gambar 2. 8 Peredaman Radikal Bebas oleh Flavonoid. (A) Struktur dasar flavonoid, (B) Mekanisme flavonoid dalam mendonorkan atom hidrogen. (Yuhernita dan Juniarti., 2011).

Secara umum, antioksidan merupakan senyawa atau reaksi yang berfungsi untuk menghilangkan, membersihkan, dan menekan pembentukan ROS, atau menghambat aksi oksidatifnya. Selain flavonoid, sejumlah unsur dan senyawa lain juga berperan dalam menjaga kualitas spermatozoa melalui aktivitas antioksidan. Ion Mn^{2+} terbukti dapat meningkatkan motilitas sperma, viabilitas, kapasitas, dan reaksi akrosom dengan cara mengurangi stres oksidatif. Penambahan ion Mn^{2+} secara ekstraseluler juga dapat meningkatkan kadar cyclic adenosine monophosphate (cAMP) melalui stimulasi enzim Ca^{2+}/Mg^{2+} -ATPase, yang selanjutnya mengaktifkan saluran kalsium sehingga meningkatkan proses reaksi akrosom. Selain itu, kelompok tiol juga berperan penting dalam mekanisme detoksifikasi dan aktivitas antioksidan terhadap ROS, serta dalam mempertahankan status redoks intraseluler. Gugus ini berperan dalam mekanisme pertahanan utama sel spermatozoa terhadap stres oksidatif (Batool *et al.*, 2024).

Quersetin merupakan salah satu jenis flavonoid yang secara alami dihasilkan oleh tanaman. Senyawa ini dikenal memiliki aktivitas antivirus, antiinflamasi, serta antioksidan. Quersetin berperan sebagai antioksidan dengan cara menetralkan radikal bebas serta mengikat ion logam bervalensi dua. Senyawa ini diduga berperan dalam menurunkan kadar hidrogen peroksida, meningkatkan sistem pertahanan antioksidan pada sperma, serta melindungi DNA dari kerusakan akibat stres oksidatif. Aktivitas antioksidan flavonoid seperti quersetin berkaitan erat dengan struktur kimianya, di mana jumlah dan posisi gugus hidroksil memengaruhi kekuatan aktivitas tersebut. Namun demikian, perlu diperhatikan bahwa flavonoid hanya bersifat protektif pada kadar rendah, sedangkan pada konsentrasi tinggi justru dapat menimbulkan efek sitotoksik dan memicu kematian sel (Seddiqi *et al.*, 2017).

Aslam dkk. (2014) menyatakan bahwa penambahan antioksidan ke dalam bahan pengencer dapat memberikan efek protektif terhadap spermatozoa dengan menghambat aktivitas radikal bebas yang berpotensi merusak membran sel. Perlindungan tersebut berkontribusi dalam mempertahankan viabilitas serta kemampuan fertilisasi spermatozoa. Hasil penelitian oleh Wijayanti dkk. (2023) menunjukkan bahwa suplementasi ekstrak teh hijau (*Camellia sinensis*) pada pengencer Tris kuning telur mampu memperbaiki kualitas spermatozoa sapi Bali (*Bos sondaicus*) setelah proses pembekuan. Perlakuan dengan konsentrasi ekstrak teh hijau 0,15 mg/100 mL menghasilkan motilitas dan viabilitas spermatozoa yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan lainnya. Efek tersebut diduga berkaitan dengan kandungan *epigallocatechin gallate* (EGCG), yaitu senyawa antioksidan yang mampu menetralkan radikal bebas, menghambat oksidasi lipid membran, serta

menjaga integritas membran plasma spermatozoa dari kerusakan yang disebabkan oleh stres oksidatif.

2.5 Metode Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan senyawa bioaktif dari bahan biologis, seperti jaringan tumbuhan atau hewan, dengan menggunakan pelarut tertentu. Proses ini bertujuan untuk memperoleh komponen metabolit yang dapat larut dalam pelarut sekaligus memisahkannya dari senyawa lain yang tidak larut (Ihsan, 2018). Efektivitas ekstraksi dipengaruhi oleh beberapa faktor, meliputi ukuran partikel bahan yang diekstraksi, jenis dan konsentrasi pelarut yang digunakan, rasio pelarut terhadap sampel, serta durasi kontak antara pelarut dan bahan selama proses ekstraksi berlangsung (Zhu *et al.*, 2011).

Keberhasilan proses pemurnian ekstrak tidak hanya ditentukan oleh jumlah rendemen yang dihasilkan, tetapi juga oleh kualitas ekstrak serta kandungan senyawa aktif yang berhasil diperoleh. Pemurnian ekstrak dapat dilakukan dengan berbagai metode, seperti pemisahan menggunakan pelarut yang tidak saling bercampur dan memiliki perbedaan densitas, pengendapan, filtrasi, pemanasan, adsorpsi menggunakan bahan penyerap, maupun pemanfaatan resin penukar ion. Oleh karena itu, penggunaan pelarut dalam proses ekstraksi memegang peranan penting dalam memperoleh ekstrak yang lebih murni dari bahan alam (Hernani, dkk., 2007).

Prinsip dasar ekstraksi pelarut didasarkan pada kesesuaian sifat kepolaran antara pelarut dan senyawa yang akan diekstraksi. Senyawa yang bersifat polar umumnya lebih mudah larut dalam pelarut polar, sedangkan senyawa nonpolar cenderung larut dalam pelarut nonpolar. Sebagai contoh, etanol, metanol, butanol,

dan air sering digunakan untuk mengekstraksi senyawa polar, sementara eter, kloroform, dan n-heksana lebih sesuai untuk senyawa nonpolar. Pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi sebaiknya memiliki kemampuan melarutkan senyawa target secara efektif, mudah diuapkan karena titik didihnya relatif rendah, aman digunakan, ekonomis, serta tidak bersifat toksik (Zhang *et al.*, 2018).

2.5.1 Ekstraksi Maserasi

Maserasi adalah metode ekstraksi yang dilakukan dengan merendam serbuk simplisia dalam pelarut tertentu selama periode waktu tertentu. Selama proses perendaman, pelarut akan menembus dinding serta membran sel sehingga senyawa aktif di dalam sel dapat larut dan berdifusi ke dalam pelarut. Perpindahan senyawa tersebut terjadi karena adanya perbedaan konsentrasi antara bagian dalam sel dan pelarut di sekitarnya hingga tercapai kondisi keseimbangan (Asworo & Widwastuti, 2023). Metode ini tidak melibatkan pemanasan sehingga cocok digunakan untuk mengekstraksi senyawa yang mudah mengalami kerusakan akibat suhu tinggi, termasuk flavonoid (Riwanti, dkk., 2020).

Sebagai pelarut polar, etanol sering dimanfaatkan dalam proses ekstraksi bahan alam karena dapat melarutkan beragam senyawa bioaktif. Selain itu, etanol mampu menembus jaringan tanaman sehingga mempercepat proses difusi senyawa aktif ke dalam pelarut (Yulianti *et al.*, 2020). Flavonoid pada umumnya memiliki sifat polar akibat keberadaan gugus gula dalam strukturnya, sehingga senyawa ini lebih mudah diekstraksi menggunakan pelarut polar seperti etanol 70% (Padmasari *et al.*, 2013).

2.6 Media Pengencer

Pengencer semen berfungsi sebagai media untuk mempertahankan kualitas spermatozoa sehingga tetap memiliki kemampuan untuk membuahi ovum. Selain itu, pengencer semen berperan dalam mendukung proses metabolisme spermatozoa, menjaga kestabilan media selama penyimpanan maupun setelah proses pencairan (*thawing*), serta mencegah kontaminasi mikroorganisme dan meminimalkan kerusakan akibat proses kriopreservasi (Bustani dan Baiee, 2021). Media penyimpanan juga harus memiliki sifat buffer untuk menjaga kestabilan pH serta mampu melindungi spermatozoa dari *cold shock* agar kondisi sel tetap stabil selama proses penyimpanan (Fariedah & Widodo, 2020).

Selain fungsi tersebut, keberadaan sumber energi juga menjadi faktor penting dalam pengencer semen. Spermatozoa memerlukan substrat energi berupa fruktosa atau glukosa yang digunakan dalam proses metabolisme untuk menghasilkan *Adenosine Triphosphate* (ATP) yang berperan dalam mendukung motilitas, serta *Adenosine Diphosphate* (ADP) sebagai bagian dari siklus energi sel (Fitri, dkk., 2022).

Media pengencer semen harus memenuhi beberapa persyaratan, antara lain menyediakan nutrisi bagi spermatozoa, tidak bersifat toksik, mampu melindungi spermatozoa dari cold shock, menghambat pertumbuhan mikroorganisme, serta menjaga keseimbangan pH dan tekanan osmotik sesuai dengan plasma semen. Berbagai bahan yang umum digunakan sebagai pengencer semen antara lain kuning telur, susu, dan air kelapa. Selain itu, larutan NaCl fisiologis, Ringer Laktat, dan Ringer Dextrose juga dapat digunakan sebagai pengencer, meskipun memiliki

karakteristik yang berbeda dalam mendukung kelangsungan hidup spermatozoa (Saefudding, dkk., 2023).

Salah satu larutan yang sering digunakan adalah NaCl fisiologis. Larutan ini bersifat isotonis sehingga mampu mempertahankan keseimbangan tekanan osmotik di sekitar spermatozoa dan menjaga integritas membran sel. NaCl fisiologis juga mudah diperoleh, relatif murah, dan sering digunakan sebagai media suspensi dalam penelitian reproduksi. Namun, larutan ini tidak mengandung nutrisi yang cukup untuk mendukung metabolisme spermatozoa dalam jangka waktu lama, sehingga penggunaannya lebih sesuai untuk penyimpanan jangka pendek atau sebagai media perlakuan dalam penelitian (Iswati, dkk., 2021).

2.7 Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini adalah pemberian ekstrak etanol 70% alfalfa (*Medicago sativa* L.) dengan berbagai konsentrasi berpengaruh terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa *Mus musculus* secara *in vitro*.

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Pendekatan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimen laboratorium dengan tujuan mengkaji pengaruh ekstrak etanol 70% alfalfa (*Medicago sativa* L.) terhadap kualitas spermatozoa. Pendekatan yang diterapkan bersifat kuantitatif karena hasil pengamatan dinyatakan dalam bentuk angka dan selanjutnya dianalisis menggunakan metode statistik. Penelitian dilaksanakan secara *in vitro* menggunakan spermatozoa yang berasal dari mencit (*Mus musculus*).

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan September 2025 – April 2026. Sampel yang digunakan dan diuji kualitasnya di Laboratorium Fisiologi Hewan, sedangkan ekstraksi dilakukan di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian mengenai pengaruh ekstrak etanol 70% alfalfa terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa secara *in vitro* menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri atas empat taraf dosis, yaitu 0%, 2%, 4%, dan 6%, dengan enam kali ulangan pada setiap perlakuan. Rumus perhitungan ulangan berdasarkan (Limbongan, 2021) adalah sebagai berikut.

$$(t - 1)(r - 1) \geq 15$$

Dimana, t : jumlah perlakuan dan r : jumlah ulangan

Sehingga, $(4 - 1)(r - 1) \geq 15$

$$3(r - 1) \geq 15$$

$$3r \geq 15 + 3$$

$$3r \geq 18$$

$$r \geq \frac{18}{3}$$

$$r = 6$$

3.4 Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Variabel bebas berupa ekstrak etanol 70% alfalfa dengan berbagai konsentrasi diantaranya 0%, 2%, 4% dan 6%.
2. Variabel terikat meliputi kualitas spermatozoa yang diukur berdasarkan motilitas, dan viabilitas pada mencit (*Mus musculus*).
3. Variabel kontrol yaitu spermatozoa mencit (*Mus musculus*) yang memiliki umur yang sama pada setiap perlakuan. Selain itu, faktor lain yang dikendalikan mencakup suhu inkubasi (37°C), durasi inkubasi, serta volume sampel yang dianalisis sepanjang penelitian.

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat – alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *buchner filtration funnel*, rotary evaporator, corong, batang pengaduk, beaker glass, erlenmeyer, cawan petri, timbangan analitik, inkubator.

3.5.2 Bahan

Bahan – bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak daun alfalfa, etanol 70%, cauda epididimis mencit (*Mus musculus*), DMSO, aquades, pewarna eosin – nigrosin, serta sodium chloride 0,9% infus, set alat bedah,

aluminium foil, tabung Eppendorf, mikropipet, spuit 3 ml, mikroskop, object glass, cover glass, dan kertas saring whatman no.1.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Alfalfa

Pembuatan ekstrak etanol alfalfa dilakukan dengan metode maserasi berdasarkan pada Safitri dkk. (2021). Serbuk simplisia alfalfa sebanyak 100 g dimaserasi menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan simplisia dan pelarut 1:10 selama 72 jam. Selama proses maserasi dilakukan pengadukan sebanyak dua kali sehari, masing-masing selama 15 menit. Kemudian, larutan disaring menggunakan kertas saring Whatman No.1 untuk memperoleh filtrat. Filtrat hasil ekstraksi diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40°C hingga sebagian besar pelarut menguap. Ekstrak yang dihasilkan disimpan dalam wadah tertutup pada suhu 4°C. Ekstrak alfalfa yang pekat dibuat larutan stok dengan melarutkannya dalam DMSO 1% (sebanyak 1 ml) untuk dilanjutkan pada tahap perlakuan sampel.

3.6.2 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Alfalfa (*Medicago sativa* L.)

Pembuatan konsentrasi ekstrak etanol 70% alfalfa dilakukan berdasarkan Fathmah, dkk (2019). larutan stok ekstrak alfalfa yang telah diperoleh kemudian diencerkan untuk menghasilkan variasi konsentrasi, yaitu 2%, 4%, dan 6%. proses pengenceran dilakukan dengan menambahkan pelarut DMSO 1% sesuai perhitungan hingga diperoleh konsentrasi yang diinginkan.

3.6.3 Aklimatisasi dan Isolasi Organ Reproduksi

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah 24 ekor mencit jantan yang berusia sekitar 2-3 bulan. Sebelum diberikan perlakuan, mencit diaklimatisasi

selama 1 minggu dalam kondisi laboratorium dengan pemberian pakan dan minum yang cukup. pemeliharaan mencit dilakukan dalam kandang yang ditutup menggunakan anyaman kawat dan ditempatkan pada ruangan dengan pencahayaan serta sirkulasi udara yang cukup (Sinata, dkk., 2023).

Isolasi organ reproduksi mencit dilakukan mengacu pada Akmal, dkk (2016). Mencit dikorbankan dengan metode dislokasi leher, kemudian dilakukan pembedahan untuk mengambil organ reproduksi. Cauda epididimis diisolasi dari testis dengan memotong bagian proksimal corpus epididimis dan bagian distal vas deferens. Selanjutnya, cauda epididimis dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah berisi larutan NaCl fisiologis 0,9%. Cauda epididimis kemudian dicacah halus menggunakan gunting, dan diaduk secara perlahan hingga terbentuk suspensi spermatozoa. Suspensi spermatozoa yang diperoleh digunakan untuk pengujian kualitas spermatozoa (Hafaz *et al.*, 2017).

3.6.4 Perlakuan Ekstrak Etanol 70% Alfalfa pada Spermatozoa

Perlakuan dilakukan dengan menambahkan ekstrak etanol 70% alfalfa ke dalam suspensi spermatozoa yang telah dibuat menggunakan larutan NaCl fisiologis 0,9% sebagai medium pengencer. Penambahan ekstrak dilakukan sesuai dengan konsentrasi perlakuan yang telah ditentukan. Volume suspensi spermatozoa dan ekstrak pada masing-masing perlakuan disesuaikan hingga mencapai total volume 200 μ L (Tabel 3.1). Selanjutnya, campuran dihomogenkan secara perlahan dan dilakukan pengamatan kualitas spermatozoa pada waktu inkubasi 0 menit dan setelah inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C.

Tabel 3.1 Komposisi Perlakuan Ekstrak Etanol Alfalfa

Perlakuan	Volume (μL) Ekstrak	Volume (μL) Suspensi Sperma	Total Volume (μL)
E0	0	200	200
E1	4	196	200
E2	8	192	200
E3	12	188	200

Keterangan: E0 = kontrol tanpa penambahan ekstrak etanol alfalfa; E1 = ekstrak etanol alfalfa konsentrasi 2%; E2 = ekstrak etanol alfalfa konsentrasi 4%; E3 = ekstrak etanol alfalfa konsentrasi 6%.

3.6.5 Uji Motilitas

Uji motilitas dilakukan dengan meneteskan 200 μL suspensi spermatozoa pada kaca objek dan ditutup dengan kaca penutup. Preparat kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya pada pembesaran 400×. Motilitas spermatozoa dinilai secara subjektif berdasarkan persentase spermatozoa yang bergerak progresif maju pada lapang pandang pengamatan. Persentase motilitas spermatozoa menurut Triyani *et al.* (2024) dapat dihitung dengan persamaan berikut.

$$\text{Motilitas (\%)} = \frac{(\text{Jumlah Spermatozoa progresif})}{(\text{Jumlah Spermatozoa yang diamati})} \times 100\%$$

Perhitungan rerata penurunan motilitas dilakukan menggunakan rumus berikut.

$$\text{Penurunan Motilitas (\%)} = \text{Persentase } m0 - \text{Persentase } m30$$

$$x = \frac{\sum x}{n}$$

Keterangan:

Persentase m0 : Persentase motilitas spermatozoa sebelum perlakuan (%)
 Persentase m30 : Persentase motilitas spermatozoa setelah inkubasi/perlakuan 30 menit (%)
 X : rerata penurunan motilitas (%)
 $\sum x$: jumlah seluruh nilai penurunan motilitas dari setiap ulangan (%)

n : jumlah ulangan

3.6.6 Uji Viabilitas

Uji viabilitas dilakukan dengan membuat larutan pewarna eosin-nigrosin yang dibuat dengan cara melarutkan 0,67gram Eosin dan 10gram Nigrosine ke dalam 100 mL aquades hingga homogen. Larutan selanjutnya dipanaskan sampai mendidih, didinginkan, lalu disaring dan disimpan dalam botol gelap sebelum digunakan. Pemeriksaan viabilitas spermatozoa dengan mencampurkan suspensi spermatozoa sebanyak 200 μ L dengan pewarna eosin nigrosin pada kaca objek. Pengamatan spermatozoa dilakukan menggunakan mikroskop cahaya. Spermatozoa yang mati ditandai dengan penyerapan zat pewarna sehingga tampak berwarna merah, sedangkan spermatozoa yang hidup tidak menyerap zat pewarna dan tampak transparan di bawah mikroskop. Persentase viabilitas spermatozoa menurut Bette, dkk (2024) dapat dihitung dengan persamaan berikut.

$$\text{Viabilitas (\%)} = \frac{\text{Jumlah Spermatozoa hidup}}{\text{Jumlah Spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

Perhitungan rerata penurunan motilitas dilakukan menggunakan rumus berikut.

$$\text{Penurunan Viabilitas (\%)} = \text{Persentase } v0 - \text{Persentase } v30$$

$$x = \frac{\sum x}{n}$$

Keterangan:

Persentase v0 : Persentase Viabilitas spermatozoa sebelum perlakuan (%)

Persentase v30: Persentase viabilitas spermatozoa setelah inkubasi/perlakuan 30 menit (%)

X : rerata penurunan viabilitas (%)

$\sum x$: jumlah seluruh nilai penurunan viabilitas dari setiap ulangan (%)

n : jumlah ulangan

3.7 Analisis Data

Analisis data mengenai kualitas spermatozoa, seperti motilitas dan viabilitas, dilakukan menggunakan perangkat lunak IBM SPSS Statistics 27. Tahap pertama analisis data dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Data penelitian dinyatakan berdistribusi normal dan homogen apabila memiliki nilai signifikansi ($\text{sig.} > 0,05$). Selanjutnya, data dianalisis menggunakan *One Way Analysis of Variance (One Way Anova)*. Jika hasil analisis menunjukkan adanya pengaruh nyata dengan nilai $\text{sig.} < 0,05$ maka dilakukan uji lanjut. Uji lanjutan yang digunakan adalah uji Duncan, yang dipilih berdasarkan pada nilai koefisien keragaman (KK) $> 10\%$ untuk mengetahui perbedaan nyata antar perlakuan.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Ekstrak Etanol 70% Alfalfa (*Medicago sativa* L.) terhadap Motilitas Spermatozoa mencit (*Mus musculus*) secara *in vitro*

Motilitas menggambarkan kemampuan spermatozoa melakukan pergerakan aktif dan terarah menuju sel telur. Motilitas berperan penting dalam proses fertilisasi karena memungkinkan spermatozoa mencapai dan membuahi sel telur. Spermatozoa dengan motilitas normal ditandai dengan gerakan maju ke depan secara lurus, cepat, lincah dan teratur (Indriyani, dkk., 2021). Kualitas spermatozoa dipengaruhi oleh keseimbangan antara produksi oksidan, khususnya ROS dengan kemampuan sistem antioksidan di sistem reproduksi. Kelebihan ROS dapat memicu stres oksidatif dan menyebabkan peroksidasi lipid pada membran spermatozoa sehingga menurunkan motilitas spermatozoa (Latifah dan Riyanti., 2025). Oleh karena itu, diperlukan senyawa antioksidan untuk membantu melindungi spermatozoa dari kerusakan oksidatif. Salah satu bahan alami yang diketahui memiliki senyawa antioksidan adalah alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Kowalczyk, 2021).

Pengamatan motilitas dilakukan menggunakan mikroskop cahaya. Spermatozoa yang menunjukkan pergerakan progresif dihitung sebagai spermatozoa motil untuk menentukan persentase motilitas pada masing – masing perlakuan. Data hasil penelitian motilitas spermatozoa pada masing – masing kelompok perlakuan setelah pemberian ekstrak etanol 70% alfalfa (*Medicago sativa* L.) secara *in vitro* selama 30 menit disajikan pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 Rerata pengaruh ekstrak etanol 70% alfalfa (*Medicago sativa* L.) terhadap motilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus*)

Perlakuan	Rerata penurunan motilitas (%) $\pm$ SD
E0 (Kontrol)	6.83 $\pm$ 4.95
E1 (2%)	4.60 $\pm$ 3.11
E2 (4%)	2.97 $\pm$ 1.95
E3 (6%)	4.27 $\pm$ 2.77

Berdasarkan tabel 4.1, pemberian ekstrak alfalfa mengalami penurunan motilitas spermatozoa setelah inkubasi selama 30 menit. Perlakuan kontrol (E0) menunjukkan rerata penurunan motilitas tertinggi sebesar 6,83%. Sedangkan pada perlakuan ekstrak etanol 70% alfalfa pada perlakuan E1 dan E2 menunjukkan kecenderungan penurunan motilitas yang semakin rendah. Perlakuan E2 (konsentrasi 4% ekstrak alfalfa) memiliki rerata penurunan motilitas paling rendah sebesar 2,97%, yang menunjukkan bahwa ekstrak alfalfa tersebut berpotensi lebih baik dalam mempertahankan motilitas sperma. Namun demikian, pada perlakuan E3 (konsentrasi 6% ekstrak alfalfa) terjadi peningkatan rerata penurunan motilitas menjadi 4,27%. Pola tersebut menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak alfalfa hingga konsentrasi tertentu mampu menghambat penurunan kualitas gerak spermatozoa, tetapi pada konsentrasi yang lebih tinggi mulai memberikan efek toksik terhadap spermatozoa sehingga kemampuan mempertahankan motilitas menurun kembali.

Kemampuan ekstrak etanol 70% alfalfa dalam menekan penurunan motilitas spermatozoa berkaitan dengan kandungan senyawa antioksidan seperti flavonoid, saponin, fitoestrogen, kumarin, alkaloid, terpenoid, asam amino, fitosterol, dan vitamin. Kandungan utama dalam ekstrak etanolik alfalfa adalah flavonoid yang

termasuk golongan senyawa polifenol dengan aktivitas antioksidan tinggi. Flavonoid berperan dalam menstabilkan senyawa radikal dan menghambat terjadinya stres oksidatif sehingga dapat membantu melindungi membran sel spermatozoa dari kerusakan (Darni, dkk., 2018). Terjaganya integritas membran sel spermatozoa berpengaruh terhadap kemampuan spermatozoa dalam mempertahankan aktivitas pergerakannya sehingga penurunan motilitas dapat ditekan. *Reactive Oxygen Species* (ROS) dapat menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa melalui kerusakan membran sel dan gangguan produksi energi di mitokondria. Peningkatan kadar ROS secara berlebihan dapat menghambat fungsi mitokondria dalam memproduksi ATP yang dibutuhkan sebagai sumber energi spermatozoa, sehingga pergerakan spermatozoa menjadi menurun (Dutta *et al.*, 2019).

Yuniar, dkk (2020) menyatakan bahwa penambahan antioksidan berhubungan positif terhadap kemampuan mempertahankan motilitas spermatozoa selama proses inkubasi. Keberadaan antioksidan mampu melindungi integritas dan fungsionalitas membran sel spermatozoa yang berhubungan langsung dengan aktivitas pergerakan spermatozoa. Hal tersebut sejalan dengan hasil penelitian ini, dimana perlakuan E1 dan E2 menunjukkan rerata penurunan motilitas yang lebih rendah dibandingkan kontrol, terutama pada perlakuan E2 yang memiliki rerata penurunan motilitas paling rendah. Kondisi tersebut menunjukkan bahwa kandungan antioksidan dalam ekstrak alfalfa mampu membantu melindungi membran sel spermatozoa dari kerusakan sehingga motilitas spermatozoa tetap terjaga.

Hasil penelitian ini juga sejalan dengan penelitian Laoung-On *et al* (2024) yang menunjukkan bahwa ekstrak benang sari *Bombax ceiba* yang mengandung senyawa fenolik dan flavonoid mampu menekan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) dan menekan proses oksidasi pada membran lipid pada membran sel spermatozoa. Mekanisme tersebut diduga juga terjadi pada perlakuan E2 (konsentrasi 4%) dalam penelitian ini, sehingga perlakuan E2 menunjukkan rerata penurunan paling rendah dibandingkan perlakuan lainnya.

Namun demikian, pada perlakuan E3 terjadi peningkatan rerata penurunan motilitas spermatozoa dibandingkan perlakuan E2. Hal tersebut diduga karena pemberian ekstrak alfalfa pada konsentrasi yang lebih tinggi mulai memberikan efek toksik terhadap spermatozoa. Selain flavonoid, ekstrak alfalfa juga mengandung alkaloid, saponin, dan tanin yang pada konsentrasi tertentu berpotensi memberikan efek sitotoksik. Alkaloid sendiri memiliki sifat beracun, terutama terhadap sel-sel yang memerlukan tingkat energi tinggi seperti sel spermatozoa, karena dapat merangsang produksi radikal bebas (Ulkhak, dkk., 2023).

Perbedaan respons pada masing-masing perlakuan berkaitan dengan kemampuan spermatozoa dalam merespons paparan senyawa bioaktif pada konsentrasi tertentu. Pada konsentrasi tertentu, peningkatan ROS yang berlebihan dapat menyebabkan ketidakseimbangan oksidatif yang berdampak pada gangguan fungsi spermatozoa. Kondisi tersebut dapat mengganggu integritas membran dan metabolisme energi spermatozoa sehingga kemampuan pergerakan spermatozoa menurun kembali (Villaverde *et al.*, 2019). Ketidakseimbangan oksidatif tersebut dapat menyebabkan gangguan metabolisme energi di mitokondria spermatozoa. Peningkatan ROS dapat menurunkan produksi ATP yang dibutuhkan spermatozoa

untuk melakukan pergerakan sehingga motilitas spermatozoa kembali mengalami penurunan (Dutta *et al.*, 2019).

Perbedaan respons spermatozoa terhadap berbagai konsentrasi ekstrak alfalfa menunjukkan bahwa pemberian senyawa bioaktif perlu memperhatikan kadar yang sesuai. Konsentrasi tertentu mampu memberikan efek protektif melalui aktivitas antioksidan, sedangkan konsentrasi yang terlalu tinggi justru dapat memicu efek toksik terhadap sel. Hal ini menunjukkan bahwa efektivitas suatu pengobatan tidak hanya dipengaruhi oleh jenis bahan yang digunakan, tetapi juga oleh kesesuaian dosis terhadap kondisi biologis sel. Dalam perspektif islam, upaya menjaga kesehatan dan mencari pengobatan merupakan bentuk ikhtiar untuk memperoleh kesembuhan seperti sabda Rasulullah saw. sebagai berikut.

مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً

Artinya: “*Tidaklah Allah menurunkan suatu penyakit kecuali menurunkan pula penyembuhnya (obat).*” (HR. Bukhari).

Menurut Al-Utsaimin dalam Syarah Shahih Al-Bukhari yang diterjemahkan oleh Al-Atsari (2010) menjelaskan, makna hadist ini perintah mencari obat. Jadi bukan sekedar berita saja, tetapi supaya seseorang berusaha mencari obat, dengan tetap mengindahkan cara-cara yang sesuai syariat, atau sesuatu yang telah terbukti melalui pancaindra bisa menyembuhkan, atau fakta telah membuktikan hal tersebut. Hal ini selaras dengan hadist lainnya sebagai berikut.

لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ، فَإِذَا أُصِيبَ دَوَاءُ الدَّاءِ بَرَأَ بِإِذْنِ اللَّهِ عَزَّ وَجَلَّ

Artinya: “*Setiap penyakit ada obatnya. Apabila obat itu sesuai dengan penyakitnya, maka penyakit itu akan sembuh dengan izin Allah Azza wa Jalla*” (H.R Muslim No. 5705).

An-Nawawi dalam Syarah Sahih Muslim yang diterjemahkan oleh Syiha (2009) menjelaskan kata دَوَاءٌ (obat) dibaca dengan Ad-Dawa'. Para dokter

mengatakan Sakit adalah ketika kondisi tubuh tidak normal. Pengobatan adalah mengembalikan tubuh kepada kondisi yang normal. Sedangkan menjaga kesehatan adalah dengan memperbaiki makanan-makanan yang bergizi dan lain sebagainya. Mengembalikan kondisi tubuh yang normal adalah dengan obat-obatan yang sesuai dan dapat melawan penyakit.” Hippocrates berkata, “Penyakit-penyakit dapat diobati dengan lawannya.” Namun, terkadang hakikat penyakit dan obat tidak diketahui banyak orang sehingga kepercayaan terhadap lawan penyakit semakin berkurang. Dari sinilah kekeliruan para dokter terjadi. Terkadang dia mengira bahwa penyakit itu berasal dari unsur panas, namun ternyata dari unsur dingin atau bukan dari unsur manapun. Atau memang dari unsur panas, namun suhu panas lebih rendah dari yang diperkirakannya, sehingga belum menghasilkan kesembuhan. Seakan-akan beliau Shallallahu alaihi wa Sallam mengisyaratkan dengan akhir sabdanya “Dengan izin Allah *Azza wa Jalla*” bahwa tidak ada yang bertentangan dengan sabdanya yang pertama “Setiap penyakit ada obatnya.” sehingga, jika ada yang mengatakan, “Kamu mengatakan bahwa setiap penyakit ada obatnya, namun kami mendapatkan banyak orang-orang sakit yang berobat tidak juga sembuh.” Maka dijawab, “Sesungguhnya itu terjadi karena pengetahuan tentang hakikat pengobatan tidak ada, bukan karena obatnya tidak ada. Ini adalah perihal yang jelas.” Wallahu A’lam.

Lebih lanjut, Al Bassam (1414) dalam Syarah Bulughul Maram yang diterjemahkan oleh Suparta (2006) menjelaskan bahwa Ibnu Qayyim, saat menuturkan beberapa hadist yang berkaitan dengan pengobatan mengatakan, hadist-hadist pengobatan tersebut menyimpan konsep sebab akibat dan menyalahkan orang-orang yang mengingkari konsep ini. Perintah berobat yang

dijelaskan oleh hadist-hadist tersebut tidak bertentangan dengan sikap tawakal. Rasulullah SAW menganjurkan agar seseorang berobat untuk sakit yang dialaminya dan memerintahkan keluarga atau teman agar berobat saat ditimpa penyakit.

Sebagaimana firman Allah SWT dalam Al-Qur'an Surah Asy-Syu'araa ayat 80 sebagai berikut.

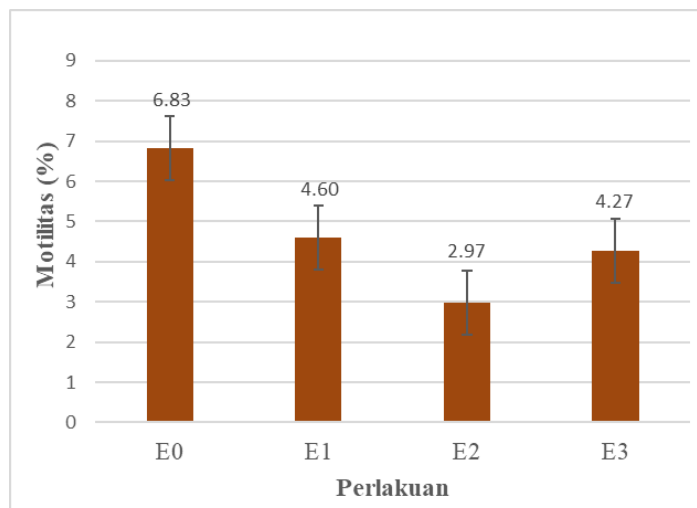
وَإِذَا مَرَضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ ٨٠

Artinya: “Apabila aku sakit, Dialah yang menyembuhkanku.” (QS. Asy-Syu'araa [26]: 80)

Makna kata (مَرَضْتُ) menurut Qurthubi dalam Tafsir Qurthubi yang diterjemahkan oleh Utsman (2009) berarti “aku sakit”, demi menjaga sopan santun, sebab sakit dan kesembuhan semuanya datang dari Allah SWT. Az-Zuhaili (2005) dalam *Tafsir Al-Munir* menjelaskan bahwa, (وَإِذَا مَرَضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ) apabila aku tertimpa sakit, Allah-lah yang memberikan kesembuhan kepadaku. Di sini Ibrahim menyandarkan bahwa sakit itu datang dari dirinya sendiri dan tidak mengatakan “Allah lah yang memberiku sakit”, sebagai bentuk etika kepada Allah SWT walaupun sesungguhnya sakit dan kesembuhan itu semuanya datangnya dari Allah Maha perkasa dan Maha bijaksana. Keduanya terjadi atas kuasa dan ketetapan dari-Nya. Lebih lanjut, Al-Sheikh dalam *Tafsir Ibnu Katsiir* yang diterjemahkan oleh Ghoffar, dkk (2004) menjelaskan bahwa firman pada ayat tersebut disandarkan penyakit kepada dirinya, sekalipun hal itu merupakan qadar, qadha dan ciptaan Allah. Akan tetapi, ia sandarkan hal itu kepada dirinya sebagai sikap beradab. Makna hal itu berarti, jika aku menderita sakit, maka tidak ada seorang pun yang kuasa menyembuhkanku selain-Nya sesuai takdir-Nya yang dikarenakan sebab yang menyampaikannya.

Menurut Shihab (2002) pada Tafsir Al-Mishbah, bahwa firman-Nya (وَإِذَا (مَرَضْتُ) berarti apabila aku sakit, berbeda dengan redaksi lainnya. Perbedaan pertama adalah penggunaan kata *idzaa* (apabila) dan mengandung makna besarnya kemungkinan atau bahkan kepastian terjadinya apa yang dibicarakan, dalam hal ini adalah sakit. Ini mengisyaratkan bahwa sakit berat atau ringan, fisik atau mental merupakan salah satu keniscayaan hidup manusia. Perbedaan kedua adalah redaksinya yang menyatakan, “Apabila aku sakit” bukan “Apabila Allah menjadikan aku sakit”. Namun demikian, dalam hal penyembuhan seperti juga dalam pemberian hidayah, makan dan minum secara tegas beliau menyatakan bahwa Yang melakukannya adalah Dia, Tuhan semesta alam itu. Dengan demikian, terlihat dengan jelas bahwa berbicara tentang nikmat secara tegas Nabi Ibrahim as. menyatakan bahwa sumbernya adalah Allah SWT., berbeda dengan ketika berbicara tentang penyakit. Ini karena penganugerahan nikmat adalah sesuatu yang terpuji, sehingga wajar disandarkan kepada Allah, penyakit adalah sesuatu yang dapat dikatakan buruk sehingga tidak wajar dinyatakan bersumber dari Allah SWT. demikian Nabi Ibrahim as. mengajarkan bahwa segala yang terpuji dan indah bersumber dari-Nya. Adapun yang tercela dan negatif, maka hendaklah terlebih dahulu dicari penyebabnya pada diri sendiri. Perlu dicatat juga bahwa penyembuhan sebagaimana ditegaskan oleh Nabi Ibrahim as. Ini bukan berarti upaya manusia untuk meraih kesembuhan tidak diperlukan lagi. Sekian banyak hadist Nabi Muhammad SAW. yang memerintahkan untuk berobat.

Pola penurunan motilitas spermatozoa pada masing-masing perlakuan dapat dilihat pada gambar 4.1.



Gambar 4.1 Rerata penurunan motilitas spermatozoa *Mus musculus* secara *in vitro* setelah pemberian ekstrak etanol 70% alfalfa (*Medicago sativa* L.)

Berdasarkan gambar 4.1, grafik menunjukkan pola penurunan motilitas yang menurun dari E0 hingga E2, kemudian meningkat kembali pada E3. Pola tersebut menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak alfalfa (*M. sativa* L.) hingga konsentrasi tertentu mampu membantu mempertahankan motilitas spermatozoa. Namun, pada konsentrasi lebih tinggi (E3) diduga mulai menunjukkan indikasi efek toksik terhadap spermatozoa sehingga kemampuan mempertahankan motilitas menurun kembali. Meskipun demikian, pengaruh ekstrak alfalfa terhadap motilitas spermatozoa sebagaimana ditunjukkan oleh rerata pada tabel 4.1, perlu diuji secara statistik untuk dapat disimpulkan apakah berpengaruh secara signifikan.

Selanjutnya dilakukan analisis secara statistik menggunakan SPSS. Sebelum dilakukan analisis lanjutan, terlebih dahulu dilakukan uji normalitas menggunakan metode *Shapiro-Wilk* serta uji homogenitas dengan *Levene's Test*. Hasil uji normalitas dan homogenitas pada pengamatan motilitas spermatozoa selama inkubasi 30 menit menunjukkan bahwa data berdistribusi normal dan

homogen. Hal tersebut ditunjukkan oleh nilai signifikansi yang lebih besar dari 0,05 ($p > 0,05$) sebagaimana tercantum pada Lampiran (2). Data yang telah memenuhi syarat uji normalitas dan homogenitas kemudian dilanjutkan dengan analisis varians satu arah (*One Way* ANOVA) (Lampiran 2.).

Hasil ANOVA (Lampiran 2) menunjukkan bahwa pengaruh ekstrak etanol 70% alfalfa (*Medicago sativa* L.) terhadap motilitas spermatozoa memiliki nilai F-hitung sebesar 1,35 lebih kecil dibandingkan F-tabel 5% sebesar 3,10. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian berbagai konsentrasi ekstrak etanol 70% alfalfa tidak memberikan pengaruh yang signifikan ($\alpha = 5\%$) terhadap penurunan motilitas spermatozoa. Oleh karena itu, uji lanjut tidak dilakukan karena hasil *One Way* ANOVA menunjukkan tidak adanya pengaruh yang signifikan antar perlakuan. Hal ini dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti lama inkubasi, kondisi spermatozoa selama proses penelitian, maupun media pengencer spermatozoa yang digunakan. Spermatozoa motil tergolong normal dan fertil pada 50-80%.

Motilitas individu spermatozoa dalam pengencer NaCl fisiologis mencapai optimal asal jenuh oksigen tetapi karena pengencer ini tidak memiliki daya penyanggah bila tanpa oksigen, maka produk akhir yang bersifat asam akan menyebabkan sel spermatozoa mati pada pH rendah. Bila terjadi peningkatan elektrolit yang berlebihan akan merusak selubung lipoprotein dinding sel spermatozoa, sehingga dapat menyebabkan kematian sel (Wiyanti, dkk., 2013).

Spermatozoa merupakan sel yang sangat sensitif terhadap perubahan kondisi lingkungan, terutama selama proses inkubasi. Oleh karena itu, suhu perlu dijaga tetap stabil agar spermatozoa dapat mempertahankan viabilitas dan motilitasnya. Perubahan suhu yang terlalu rendah maupun terlalu tinggi dapat

menyebabkan kerusakan membran sel sehingga fungsi spermatozoa menurun. Selain itu, interval waktu penanganan yang terlalu lama juga dapat memengaruhi kualitas spermatozoa (Fahlevi, dkk., 2025). Spermatozoa rentan mengalami stres osmotik dan kerusakan akibat radikal bebas yang dapat meningkatkan stres oksidatif serta merusak membran dan DNA spermatozoa selama proses penanganan (Riskiawati dan Ernawati, 2025). Oleh karena itu, diperlukan perlakuan tambahan seperti pemberian antioksidan, vitamin, maupun hormon tertentu untuk membantu mempertahankan kualitas spermatozoa selama proses inkubasi.

Penambahan senyawa antioksidan diketahui mampu membantu melindungi membran spermatozoa dari kerusakan akibat stres oksidatif sehingga motilitas spermatozoa dapat dipertahankan. Penelitian Yilmazer *et al* (2024) menunjukkan bahwa kombinasi suplementasi vitamin D, vitamin E, selenium dan zinc mampu membantu meningkatkan motilitas spermatozoa serta menekan pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Vitamin E berperan sebagai antioksidan yang melindungi membran spermatozoa dari peroksidasi lipid, sedangkan selenium dan zinc membantu mempertahankan aktivitas enzim antioksidan serta metabolisme energi spermatozoa. Selain itu, vitamin D berperan dalam mendukung fungsi reproduksi dan aktivitas pergerakan spermatozoa. Kombinasi senyawa tersebut mampu membantu menjaga integritas membran dan fungsi mitokondria spermatozoa sehingga motilitas spermatozoa dapat dipertahankan selama proses inkubasi.

4.2 Pengaruh Ekstrak Etanol 70% Alfalfa (*Medicago sativa* L.) terhadap Viabilitas Spermatozoa

Viabilitas merupakan kemampuan sel spermatozoa untuk tetap hidup dalam kondisi lingkungan tertentu. Spermatozoa hidup ditandai dengan membran plasma yang masih utuh sehingga tidak menyerap pewarna eosin, sedangkan spermatozoa mati akan menyerap pewarna akibat kerusakan membran sel (Gambar 4.2). Penurunan viabilitas dapat dipengaruhi oleh stres oksidatif akibat peningkatan *reactive oxygen species (ROS)* yang dapat merusak membran sel spermatozoa. Oleh karena itu, diperlukan antioksidan untuk membantu mempertahankan kualitas spermatozoa. Salah satu bahan alami yang diketahui memiliki kandungan antioksidan adalah alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Indriyani, dkk., 2021).



Gambar 4.2 Hasil pengamatan spermatozoa pada uji viabilitas menggunakan mikroskop cahaya pada perbesaran 400x dengan pewarna eosin nigrosin. (a) sperma hidup berwarna transparan (b) sperma mati berwarna gelap

Data rerata pengaruh ekstrak etanol 70% alfalfa terhadap viabilitas spermatozoa secara *in vitro* disajikan pada tabel berikut.

Tabel 4.2 Rerata penurunan viabilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus*) setelah pemberian ekstrak etanol 70% alfalfa (*Medicago sativa* L.) secara *in vitro*

Perlakuan	Penurunan Viabilitas (%) pada ulangan ke-						Total	Rerata
	1	2	3	4	5	6		
E0 (Kontrol)	8.67	7.72	6.42	9.46	8.81	9.23	50.30	8.38
E1 (2%)	2.88	2.87	7.26	6.64	4.23	8.54	32.42	5.40
E2 (4%)	2.75	1.83	5.43	4.17	2.49	6.63	23.31	3.88
E3 (6%)	4.39	8.18	6.00	6.84	8.26	9.31	42.98	7.16

Berdasarkan tabel 4.2, pemberian ekstrak alfalfa mengalami penurunan viabilitas spermatozoa setelah inkubasi selama 30 menit. Perlakuan kontrol (E0) menunjukkan rerata penurunan viabilitas tertinggi sebesar 8,38%. Sedangkan pada perlakuan ekstrak alfalfa, perlakuan E1 dan E2 menunjukkan penurunan viabilitas yang semakin rendah. Perlakuan E2 (konsentrasi 4% ekstrak alfalfa) memiliki rerata penurunan viabilitas paling rendah sebesar 3,88% yang menunjukkan bahwa ekstrak alfalfa tersebut berpotensi lebih baik dalam mempertahankan viabilitas spermatozoa. Namun demikian, pada perlakuan E3 terjadi peningkatan rerata penurunan viabilitas menjadi 7,16%. Pola tersebut menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak alfalfa hingga konsentrasi tertentu mampu menghambat penurunan viabilitas spermatozoa, tetapi pada konsentrasi yang lebih tinggi mulai memberikan efek toksik terhadap spermatozoa sehingga kemampuan mempertahankan viabilitas menurun kembali. Pola perubahan viabilitas yang diperoleh menunjukkan kecenderungan yang serupa dengan parameter motilitas (Tabel 4.1).

Tanaman alfalfa (*M. sativa* L.) mengandung senyawa fenolik dan flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Flavonoid merupakan salah satu golongan senyawa fenolik yang berperan penting dalam melawan radikal bebas

(Marabijala, dkk., 2025). Penambahan antioksidan dapat membantu mempertahankan kelangsungan hidup spermatozoa dengan melindungi membran lipid dari kerusakan akibat peroksidasi. Antioksidan bekerja dengan mencegah kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas melalui penghentian reaksi oksidatif berantai (Pandahuki *et al.*, 2024).

Ketidakseimbangan antara produksi ROS dan kemampuan sistem antioksidan dalam menetralisir radikal bebas dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Kondisi tersebut menyebabkan kerusakan berbagai struktur seluler, terutama membran plasma yang banyak mengandung asam lemak tak jenuh ganda, serta molekul penting seperti DNA dan protein (Moretti *et al.*, 2023). Spermatozoa sangat rentan mengalami stres oksidatif karena memiliki kandungan enzim antioksidan dan sitoplasma yang relatif rendah, sehingga kemampuannya dalam menetralisir ROS dalam jumlah tinggi menjadi terbatas (Kowalczyk, 2022).

Hal tersebut sejalan dengan penelitian Leyn, dkk (2021) yang menyatakan bahwa penambahan antioksidan dari ekstrak kulit buah naga mampu membantu mempertahankan viabilitas spermatozoa. Kandungan antioksidan pada ekstrak tersebut mampu mencegah dan mengurangi peroksidasi lipid akibat radikal bebas sehingga kerusakan membran plasma spermatozoa dapat diminimalkan. Kondisi tersebut membantu mempertahankan proses metabolisme dan fungsi fisiologis spermatozoa sehingga viabilitas spermatozoa tetap terjaga. Penambahan zat antioksidan pada media pengencer juga diketahui berperan dalam melindungi membran spermatozoa dari kerusakan oksidatif serta membantu mempertahankan kualitas spermatozoa selama proses inkubasi.

Namun demikian, pada perlakuan E3 terjadi peningkatan rerata penurunan viabilitas spermatozoa dibandingkan perlakuan E2. Kondisi tersebut dapat disebabkan konsentrasi ekstrak yang terlalu tinggi mengindikasikan efek toksik terhadap spermatozoa. Rivera *et al* (2020) menyatakan bahwa efek toksik yang muncul dapat disebabkan oleh akumulasi komponen antioksidan yang berlebihan dalam media penyimpanan semen cair. Ketidakseimbangan secara tidak langsung dan memperburuk kerusakan spermatozoa. Penelitian Ervandi, dkk (2025) menyatakan bahwa pemberian *glutathione* dalam konsentrasi tinggi dapat menyebabkan deformasi kepala dan ekor spermatozoa. Kondisi tersebut berkaitan dengan perubahan membran plasma spermatozoa akibat peran glutathione yang tidak seimbang dalam lingkungan semen.

Sebagaimana hasil yang didapatkan pada tabel 4.4, maka selanjutnya dilakukan analisis secara statistik menggunakan SPSS. Sebelum dilakukan analisis lanjutan, terlebih dahulu dilakukan uji normalitas menggunakan metode Shapiro-Wilk serta uji homogenitas dengan Levene's Test. Hasil uji normalitas dan homogenitas pada pengamatan viabilitas selama inkubasi 30 menit menunjukkan bahwa data berdistribusi normal dan homogen. Hal tersebut ditandai dengan nilai signifikansi yang lebih besar dari 0,05 ($p > 0,05$) sebagaimana tercantum pada Lampiran (4). Data yang telah memenuhi syarat uji normalitas dan homogenitas kemudian dilanjutkan dengan analisis varians satu arah (*One Way ANOVA*) yang disajikan pada Lampiran (4).

Hasil ANOVA (Lampiran 4.) menunjukkan bahwa pengaruh ekstrak etanol 70% alfalfa (*Medicago sativa* L.) terhadap viabilitas spermatozoa memiliki nilai F-hitung sebesar 6,80 lebih besar dibandingkan F-tabel 5%. Hal ini menunjukkan

bahwa pemberian berbagai konsentrasi ekstrak etanol 70% alfalfa memberikan pengaruh yang signifikan pada $\alpha = 5\%$ terhadap perubahan viabilitas spermatozoa antar kelompok perlakuan. Oleh karena itu, analisis dilanjutkan dengan uji lanjut duncan. Uji lanjut duncan digunakan karena hasil ANOVA menunjukkan adanya pengaruh yang signifikan dan nilai koefisien keragaman (KK) pada viabilitas menunjukkan $> 10\%$. Hasil uji lanjut Duncan disajikan dalam tabel berikut.

Tabel 4.3 Hasil uji lanjut duncan pengaruh ekstrak etanol 70% alfalfa (*Medicago sativa* L.) terhadap viabilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus*) secara *in vitro*

Perlakuan	Rerata (%) $\pm$ SD
E0 (Kontrol)	8.38 ± 1.13^a
E1 (2%)	5.40 ± 2.40^{ab}
E2 (4%)	3.88 ± 1.86^{bc}
E3 (6%)	7.16 ± 1.78^c

Keterangan: Notasi dengan huruf yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan signifikan pada taraf 5%

Hasil uji Duncan pada Tabel 4.3 menunjukkan adanya perbedaan nyata antarperlakuan terhadap penurunan viabilitas spermatozoa selama inkubasi 30 menit, yang ditunjukkan oleh notasi huruf yang berbeda. Perbedaan viabilitas spermatozoa menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol 70% alfalfa (*Medicago sativa* L.) memberikan pengaruh yang berbeda terhadap penurunan viabilitas spermatozoa setelah inkubasi selama 30 menit. Perlakuan E2 menghasilkan rerata penurunan viabilitas spermatozoa paling rendah sebesar 3,88% yang berada pada notasi bc. Perlakuan E2 tidak berbeda nyata dengan perlakuan E1 yang memiliki notasi ab maupun perlakuan E3 yang memiliki notasi c karena masih memiliki

huruf yang sama pada notasinya. Namun, perlakuan E2 berbeda nyata dengan perlakuan E0 yang berada pada notasi a. Hasil ini menunjukkan bahwa perlakuan E2 mampu mempertahankan viabilitas spermatozoa lebih baik dibandingkan perlakuan E0 (kontrol) selama proses inkubasi.

Sementara itu, perlakuan E0 menunjukkan rerata penurunan viabilitas spermatozoa tertinggi sebesar 8,38 yang berada pada notasi a. Perlakuan E0 (kontrol) tidak berbeda nyata dengan perlakuan E1 yang memiliki notasi ab, tetapi berbeda nyata dengan perlakuan E2 dan E3 yang memiliki notasi berbeda. Tingginya penurunan viabilitas pada perlakuan E0 mengindikasikan bahwa spermatozoa mengalami penurunan viabilitas yang lebih besar selama inkubasi dibandingkan perlakuan E2 dan E3.

Spermatozoa merupakan sel yang sangat rentan terhadap kerusakan oksidatif karena membrannya mengandung asam lemak tak jenuh ganda (PUFA) dalam jumlah tinggi. PUFA mudah mengalami serangan oksidatif oleh ROS yang dapat memicu peroksidasi lipid. Proses tersebut menyebabkan kerusakan integritas dan fungsi membran spermatozoa sehingga dapat menurunkan kemampuan spermatozoa untuk bertahan hidup (Wang *et al.*, 2025). Kerusakan membran akibat peroksidasi lipid menyebabkan permeabilitas membran plasma meningkat sehingga spermatozoa kehilangan kemampuan mempertahankan fungsi fisiologis (Van-Tran *et al.*, 2016). Oleh karena itu, kandungan antioksidan pada ekstrak alfalfa diduga berperan dalam melindungi membran spermatozoa dari kerusakan oksidatif sehingga viabilitas spermatozoa dapat dipertahankan selama proses inkubasi.

Penurunan motilitas individu dan viabilitas spermatozoa terjadi karena pengencer NaCl fisiologis merupakan larutan garam sederhana dengan kemampuan

yang terbatas, serta adanya aktivitas metabolik spermatozoa yang dapat menghasilkan senyawa bersifat toksik bagi sel itu sendiri. Yulnawati dan Setiadi (2005) menyatakan bahwa spermatozoa yang telah mati dapat memberikan efek toksik terhadap spermatozoa lain yang masih hidup, sehingga secara umum kualitas semen akan menurun. Keberadaan senyawa toksik, baik yang berasal dari spermatozoa yang mati maupun hasil oksidasi komponen pengencer selama penyimpanan, dapat meningkatkan pembentukan radikal bebas yang berpotensi merusak integritas membran plasma spermatozoa. Campuran antara larutan NaCl dengan plasma semen yang seimbang dapat menciptakan kondisi isotonis sehingga mampu mempertahankan daya hidup spermatozoa. Proses osmosis hanya terjadi apabila terdapat perbedaan konsentrasi zat terlarut yang tidak dapat melewati membran plasma antara intrasel dan ekstrasel. Ion natrium merupakan komponen utama cairan ekstrasel yang berperan penting dalam mengatur tekanan osmotik. Selain itu, penurunan motilitas dan viabilitas juga diduga berkaitan dengan peran ion kalsium, di mana pelepasan ion Ca^{2+} intraseluler spermatozoa dapat bereaksi dengan ion Cl^- dalam pengencer (Wiyanti, dkk., 2013).

Berdasarkan kedua penjelasan tersebut, dapat disimpulkan bahwa ion Na^+ dalam pengencer NaCl berperan dominan dalam menjaga osmolaritas ekstraseluler yang berinteraksi dengan plasma semen, sedangkan ion Ca^{2+} berpengaruh terhadap kondisi internal spermatozoa. Keseimbangan kedua kondisi tersebut memungkinkan pengencer NaCl menciptakan lingkungan isotonis yang dapat mempertahankan kelangsungan hidup spermatozoa.

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang didapat dari penelitian ini bahwa pemberian ekstrak etanol alfalfa (*Medicago sativa* L.) sebagai sumber antioksidan secara *in vitro* memiliki respons yang berbeda terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa *Mus musculus*. Pemberian ekstrak alfalfa tidak berpengaruh terhadap motilitas spermatozoa. Pemberian ekstrak alfalfa pada viabilitas berpengaruh terhadap viabilitas spermatozoa *Mus musculus* secara *in vitro*. Perlakuan E2 (konsentrasi 4%) menunjukkan kemampuan terbaik dalam mempertahankan viabilitas spermatozoa, dengan rerata viabilitas yang dihasilkan sebesar 3,88%.

5.2 Saran

Saran dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan penggunaan media pengencer sebagai sumber nutrisi pada spermatozoa.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan jumlah lapang pandang yang lebih banyak untuk meningkatkan ketelitian dan mengurangi subjektivitas dalam penilaian kualitas spermatozoa.
3. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan mengamati berbagai parameter lain seperti morfologi, integritas membran plasma, dan lain sebagainya.
4. Perlu dilakukan penelitian melakukan pengukuran kadar ROS atau MDA untuk membuktikan mekanisme antioksidan ekstrak alfalfa dalam mempertahankan kualitas spermatozoa.

DAFTAR PUSTAKA

- Akmal, R., Kuswanto, S. F., Rahmi, R. A., Bayanil, N. E. P., & Nurliani, A. (2016). Efek Spermisida Ekstrak Metanol Biji Buah Kalangkala (*Litsea angulata*) terhadap Spermatozoa Mencit (*Mus musculus*). *Journal of Agromedicine and Medical Sciences*. 2(2): 18-23.
- Al-Bassam, A. *Syarah Bulughul Maram*. Diterjemahkan oleh Suparta, T. (2006). Jakarta: Pustaka Azzam.
- Albrechtová, J., Albrecht, T., Ďureje, L., Pallazola, V. A., & Piálek, J. (2014). Sperm Morphology in Two House Mouse Subspecies: Do Wild-Derived Strains and Wild Mice Tell the Same Story. *PLoS One*, 9(12), e115669.
- Al-Neem. (2008). Influence of water stress on water use efficiency and dry-hay production of alfalfa in Alabsa. *International Journal of Soil Science.Academic J. Inc*, 3(3), 119 – 126.
- Al-Qurthubi, Abu ‘Abdullah Muhammad bin Ahmad al-Anshari. *Tafsir Al-Qurthubi: Al-Jāmi ‘li Ahkām al-Qur’ān*. Diterjemahkan oleh Utsman, M.H. (2009). Jakarta: Pustaka Azzam.
- Al-Sheikh, I. *Tafsir Ibnu Katsir*. Diterjemahkan oleh Ghoffar, M.A., dkk. (2004). Bogor: Pustaka Imam Asy-Syafi’i.
- Al-Utsaimin, M. *Syarh Shahih Al-Bukhari*. Diterjemahkan oleh Al-Atsari, A.I. (2010). Jakarta: Darus Sunnah Press.
- Andarina, R., & Djauhari, T. (2017). Antioksidan dalam dermatologi. *Jurnal Kedokteran Dan Kesehatan*, 4(1), 39-48.
- An-Nawawi, I. *Syarah Shahih Muslim*. Diterjemahkan oleh Syiha, K.M. (2009). Jakarta: Darus Sunnah Press.
- Aslam HA, Dasrul, Rosmaidar. (2014). Pengaruh Penambahan Vitamin C dalam Pengencer Andromed terhadap Persentase Motilitas dan Membran Plasma Utuh Spermatozoa Sapi Aceh Setelah Pembekuan. *J. Med. Vet*. 8(1): 20-26.
- Asworo, R. Y., & Widwastuti, H. (2023). Pengaruh ukuran serbuk simplisia dan waktu maserasi terhadap aktivitas antioksidan ekstrak kulit sirsak. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Education*, 3(2).
- Ath-Thabari, Abu Ja’far Muhammad. *Tafsir Ath-Thabari*. Diterjemahkan oleh Al-Bakri, A.A., dkk. (2007). Jakarta: Pustaka Azzam
- Az-Zuhaili, W. (2005). *Tafsir Al-Munir: Akidah, Syariah, & Manhaj Jilid 1*. Diterjemahkan oleh Kattani, A.H., dkk. (2013). Jakarta: Gema Insani.
- Bagavathiannan, M. V., & Van Acker, R. C. (2009). The biology and ecology of Feral Alfalfa (*Medicago sativa* L.) and its implications for novel trait confinement in North America. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 28(1–2), 69–87. <https://doi.org/10.1080/07352680902753613>
- Bansal, A. K. (2014). Antioxidants and other potent strategies to reduce oxidative stress in semen. In *Free Radicals in Human Health and Disease* (pp. 381-395). New Delhi: Springer India.
- Batool, I., Fayyaz, M. H., Hameed, A., Andrabi, S. M. H., Kausar, R., Shahzad, M., ... & Hussain, T. (2024). Quercetin in semen extender improves frozen-thawed spermatozoa quality and in-vivo fertility in crossbred Kamori goats. *Frontiers in Veterinary Science*, 11, 1385642.
- Bette, Y. Y., Nalley, W. M., & MataHine, T. (2024). Natural honey supplementation in Tris-egg yolk diluent as Carbohydrate source replacing

- Fructose in Etawah Crossbred Goat semen. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*, 12(1), 49-62.
- Bora, K. S., & Sharma, A. (2011). Phytochemical and pharmacological potential of *Medicago sativa*: A review. *Pharmaceutical Biology*, 49(2), 211–220. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.504732>
- Braune, A., Wehrend, A., Kauffold, J., Farshad, A. (2025). Comparative Assessment of Sperm Morphology in Liquid-Preserved Boar Semen Using Cytological Stains. *Animals*, 15(18), 2737.
- Busman, H., & Sutyarso, S. (2021). Penurunan Kualitas dan Kuantitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus* L.) Setelah Pemberian Ekstrak Rimpang Rumput Teki (*Cyperus rotundus* L.). *Al-Hayat: Journal of Biology and Applied Biology*, 4(1), 75-85.
- Bustani, G. S., & Baice, F. H. (2021). Semen extenders: An Evaluative Overview of Preservative Mechanisms of Semen and Semen Extenders. *Veterinary World*, 14(5), 1220.
- Chen L. (2012). The role of antioxidant in photoprotector: a critical review. *J Am Acad Dermatol*. 67(5): 1013-24.
- Darni, J., Gz, S., & Gizi, M. (2018). Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Alfalfa (*Medicago sativa*) terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus Hiperkolesterolemia. *Darussalam Nutrition Journal*, 2(2), 6-13.
- Darni, J., Tjahjono, K., & Sofro, M. A. U. (2016). Pengaruh pemberian ekstrak daun Alfalfa (*Medicago sativa*) terhadap profil lipid dan kadar malondialdehid tikus hiperkolesterolemia. *Jurnal Gizi Klinik Indonesia*, 13(2), 51-58.
- Dewi, N. W. A. T., Suardika, A., & Mulyana, R. S. (2019). Faktor penyebab infertilitas pasien program IVF (*in vitro fertilization*) di klinik graha tunjung RSUP sanglah. *Intisari Sains Medis*, 10(3).
- Doss, A., Parivuguna, V., Vijayasanthi, M., & Surendran, S. (2011). Antibacterial evaluation and phytochemical analysis of *Medicago sativa* L. against some microbial pathogens. *Indian Journal of Science and Technology*, 4(5), 550–552. <https://doi.org/10.30906/1999-5636-2009-1-i-102-103>
- Dutta, S., Majzoub, A., & Agarwal, A. (2019). Oxidative Stress and Sperm Function: A Systematic Review on Evaluation and Management. *Arab journal of urology*, 17(2), 87-97.
- Ervandi, M., Mokoolang, S., & Ananda, S. (2025). Suplementasi Level Glutathione Pada Pengencer Semen Cair Dalam Mempertahankan Kualitas Semen Sapi Peranakan Ongole (PO) Selama Simpan Dingin. *Jurnal Ilmu dan Industri Peternakan*, 11(1), 9-25.
- Erviana, L., Malik, A., & Najib, A. (2016). Uji aktivitas antiradikal bebas ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) dengan menggunakan metode dpph. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 3(2), 164-168.
- Fahlevi, R., Yunita, C. N., Pradana, D. K., Dewi, S., & Falah, R. R. (2025). Pengaruh Penambahan L-Arginin terhadap Total Spermatozoa Motil (TSM) pada Semen Beku Kambing Boer. *Journal of Agriculture and Animal Science*, 5(2), 179-186.
- Fathmah, E. N., Pujiyanto, S., & Raharjo, B. (2019). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol dan Etil Asetat Batang Tanaman Brotowali (*Tinospora crispa*, L. Miers) terhadap Bakteri *Escherichia coli* Enteropatogenik (EPEC) Penyebab Penyakit Diare. *Bioma: Berkala Ilmiah Biologi*, 21(1), 1-8.

- Fariedah, F., & Widodo, M. S. (2020). Kombinasi Ekstender Larutan Sari Kurma (*Phoenix dactylifera*) dan Ringer Laktat dalam Kualitas Spermatozoa Beberapa Ikan Air Tawar. *Journal of Aquaculture and Fish Health*, 9(3), 182–188.
- Fraczek, M., & Kurpisz, M. (2005). The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa. *Postepy higieny i medycyny doswiadczałnej (Online)*, 59, 523–534.
- Fitri, L., Wisudyanti, D., Santoso, M., Ekasanti, A., Listiowati, E., & Nugrayani, D. (2022). Pengaruh rasio pengenceran berbeda terhadap kualitas sperma ikan nilem (*Osteochillus hasselti*) yang disimpan dalam ekstender sari kurma, susu dan kuning telur. *Jurnal Perikanan Pantura (JPP)*, 5(1), 114–122.
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., ... & Shimomura, I. (2017). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of clinical investigation*, 114(12), 1752–1761.
- Gomathi, R., Banu, S., & Usha, K. (2016). Phytochemical analysis and free radical scavenging potential of *Medicago Sativa* Linn Seeds. *International Research Journal of Pharmacy*, 7(6), 71–76. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.07667>
- Hafaz, N. A. Brahmadhi, A., Putri, P.M. (2017). The Effect of Fasting to The Quality of Spermatozoa in Adult Male *Rattus norvegicus*. *JKKI: Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*. 8 (2): 87-95.
- Hanif, M. A., Al-Maskari, A. Y., Al-Sabahi, J. N., Al-Hdhrami, I., Khan, M. M., Al-Azkawi, A., & Hussain, A. I. (2015). Chemical characterisation of 57 bioactive compounds in *Medicago sativa* growing in the desert of Oman. *Natural Product Research*, 29(24), 2332–2335. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1008474>
- Hernani, Mawarti. T, Winarti. C. (2007). Pemilihan Pelarut pada Pemurnian Ekstrak Lengkuas (*Alpinia galanga*) secara Ekstrasi. *Pasca panen* 4(1): 1-8.
- Hickman, D. L., Johnson, J., Vemulapalli, T. H., Crisler, J. R., & Shepherd, R. (2016). Commonly used animal models. *Principles of animal research for graduate and undergraduate students*, 117.
- Huang, Y., Li, X., Sun, X., Yao, J., Gao, F., Wang, Z., ... & Xie, Y. (2022). Anatomical Transcriptome Atlas of The Male Mouse Reproductive System During Aging. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 782824.
- Hussain, T., Kandeel, M., Metwally, E., Murtaza, G., Kalhor, D. H., Yin, Y., ... & Kalhor, M. S. (2023). Unraveling the harmful effect of oxidative stress on male fertility: A mechanistic insight. *Frontiers in endocrinology*, 14, 1070692.
- Ihsan, Bachtiar, R.P. (2018). Validasi Metode Ultra HighPerformance Chromatography Double Mass Spectrometry (UHPLC-MS/MS) untuk Analisis Kurkumin pada Ekstrak Etanol Kunyit (*Curcuma longa*) dengan Berbagai Perbandingan: *Pharmaceutical Journal of Indonesia*. Vol. 4(1): 29-34.

- iNaturalist. (2025). *Medicago sativa*.
<https://www.inaturalist.org/observations/324352501>. Diakses 3 November 2025.
- Indriyani, I., Busman, H., Sutyarso, S. (2021). Penurunan Kualitas dan Kuantitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus* L.) Setelah Pemberian Ekstrak Rimpang Rumpun Teki (*Cyperus rotundus* L.). *Al-Hayat: Journal of Biology and Applied Biology*, 4(1), 75-85.
- Insani, K., Rahayu, S., Pramana, A., & Soewondo, A. (2014). Kadar MDA spermatozoa setelah proses pembekuan. *Biotropika: Journal of Tropical Biology*, 2(3), 142-147.
- Iswati, I., Natsir, M. H., Ciptadi, G., & Susilawati, T. (2021). Pengaruh NaCl fisiologis dan ringer laktat terhadap kualitas spermatozoa pada suhu ruang dan fertilitas telur ayam buras. *Jurnal Peternakan Indonesia*, 23(1), 33-42.
- Iqra, K. N., Amelia, A. C. R., Tarigan, S. N. Z. B. R., Akbar, I. Q., Ahda, Y., & Atifah, Y. (2023). Pengaruh Pemberian Ekstrak Jahe Merah (*Zingiber Officinale* Var. Rubrum) dalam Meningkatkan Motilitas dan Morfologi Spermatozoa Mencit (*Mus Musculus* L.). *Jurnal Ilmu Kedokteran dan Kesehatan*, 10(12), 3417-3425.
- Jurewicz, J., Dziewirska, E., Radwan, M., & Hanke, W. (2018). Air pollution from natural and anthropic sources and male fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1), 109.
- Kaltsas, A., Papaharitou, S., Sengupta, P., Saleh, R., & Agarwal, A. (2026). Oxidative Stress, Sperm DNA Fragmentation, or Both? Optimizing Test Selection in Male Infertility Evaluation. *Antioxidants*, 15(3), 293.
- Kim, S., Han, D., Ryu, J., Kim, K., & Kim, Y. H. (2021). Effects of mobile phone usage on sperm quality—No time-dependent relationship on usage: A systematic review and updated meta-analysis. *Environmental research*, 202, 111784.
- Kowalczyk, A. (2022). The role of the natural antioxidant mechanism in sperm cells. *Reproductive Sciences*, 29(5), 1387-1394.
- Laoung-On, J., Ounjaijean, S., Sudwan, P., & Boonyapranai, K. (2024). Phytochemical Screening, Antioxidant Effect and Sperm Quality of The Bomba Ceiba Stamen Extracts on Charolais Cattle Sperm Induced by Ferrous Sulfate. *Plants*. 13(7): 960.
- Latifah, K. U., & Riyanti, F. (2025). Peran Asupan Antioksidan terhadap Kualitas Sperma. *Jurnal Lantera Ilmiah Keperawatan*, 3(2), 15-21.
- Leyn, M. F., Belli, H., Nalley, W. M., Kune, P., & Hine, T. M. (2021). Kualitas Spermatozoa Kambing Bligon Dalam Pengencer Tris-Kuning Telur Dengan Penambahan Berbagai Level Ekstrak Kulit Buah Naga. *Jurnal Nukleus Peternakan*, 8(1), 23-32.
- Limbongan, Y. (2021). *Statistika Dan Perancangan Percobaan*. Toraja: UKI Toraja Press
- Liu, Y. T., Lu, B. N., Xu, L. N., Yin, L. H., Wang, X. N., Peng, J. Y., & Liu, K. X. (2010). The antioxidant activity and hypolipidemic activity of the total flavonoids from the fruit of *Rosa laevigata* Michx. *Natural science*, 2(3), 175-183.

- Marabijala, J.M., Nalley, W. M., Lawa, A. B. (2025). Efek Sari Daun Sereh Wangi Terhadap Kualitas Semen Babi Landrace X Duroc Dalam Pengencer Tris-Kuning Telur. *Jurnal Kajian Veteriner*, 13(2), 188-196.
- Masyitoh, H., Suprayogi, T. W., Praja, R. N., Srinto, P., Madyawati, S. P., & Saputro, A. L. (2018). Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa kambing sapera dalam pengencer tris kuning telur dan susu skim kuning telur before freezing. *Jurnal Medik Veteriner*, 1(3), 105-112.
- Montjean, D., Godin Pagé, M. H., Bélanger, M. C., Benkhalifa, M., & Miron, P. (2023). An overview of e-cigarette impact on reproductive health. *Life*, 13(3), 827.
- Moretti, E., Signorini, C., Corsaro, R., Giamalidi, M., & Collodel, G. (2023). Human Sperm as an *In vitro* Model to Assess the Efficacy of Antioxidant Supplements During Sperm Handling: A narrative review. *Antioxidants*, 12(5), 1098.
- Muharani, S., Nissha, D.K., Anggraeni. N.P., Situmorang, R. (2025). Pengaruh Pemberian Ekstraksi tanaman tebu hitam (*Saccharum officinarum* L.) terhadap Kualitas kesuburan spermatozoa mencit jantan (*Mus musculus* L.). *Jurnal Pendidikan Tambusai*. 9 (2):13832-13837.
- Muthusami, K. R., & Chinnaswamy, P. (2005). Effect of chronic alcoholism on male fertility hormones and semen quality. *Fertility and sterility*, 84(4), 919-924.
- Native Plant Trust. (2025). *Medicago sativa* — purple medick. <https://gobotany.nativeplanttrust.org/species/medicago/sativa/>. Diakses 3 November 2025.
- Ningsih, I. S., Chatri, M., & Advinda, L. (2023). Flavonoid active compounds found in plants. *Serambi Biologi*, 8(2), 126-132.
- Noori S. (2012). An overview of oxidative stress and antioxidant defensive system. *Sci Rep*. 1(8): 1-9.
- Nugroho, R.A. (2018). *Mengenal Mencit Sebagai Hewan Laboratorium*. Samarinda. Mulawarman University Press.
- Padmasari, P. D., Astuti, K. W., dan Warditiani, N. K. (2013). Skrining fitokimia ekstrak etanol 70% rimpang bangle (*Zingiber purpureum* Roxb.). *Jurnal Farmasi Udayana*, 2(4).
- Pandahuki, F. O., Nalley, W. M., Uly, K., & Hine, T. M. (2024). Pengaruh Penambahan Ekstrak Biji Kelor Kering (*Moringa oleifera* Lam) dalam Pengencer Beltsville Thawing Solution terhadap Kualitas Semen Cair Babi Landrace. *Animal Agricultura*, 2(1), 488-498.
- Prasetyo, B. (2014). Minimalisasi kerusakan spermatozoa kambing peranakan etawah akibat radikal bebas selama periode cryopreservation dengan penambahan a tokoferol dari ekstrak limbah edamame dalam skim milk dilution. *Jurnal Ilmiah Inovasi*, 14(2).
- Procházková, D., Boušová, I., & Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4), 513-523.
- Rad, M. K., Ghani, A., & Ghani, E. (2021). In vitro effects of *Capparis spinosa* L. extract on human sperm function, DNA fragmentation, and oxidative stress. *Journal of ethnopharmacology*, 269, 113702.
- Rahmadiani, D., Susianti, N., Karima, N., & Setiorini, A. (2023). Pengaruh ekstrak buah kurma Sukkari terhadap konsentrasi dan viabilitas sperma tikus putih

- galur *Sprague-Dawley* yang diinduksi gelombang elektromagnetik telepon seluler. *Jurnal Penelitian Perawat Profesional*, 5(4), 1–10.
- Ridhoila, I., Yusrawati, Y., & Amir, A. (2017). Perbandingan Kualitas Spermatozoa Pada Analisis Semen Pria Dari Pasangan Infertil Dengan Riwayat Merokok Dan Tidak Merokok. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 6(2), 259-264.
- Rivera, A., N. Castro, & L. Gutierrez. (2020). Negative Effects of Over-Supplementation of Glutathione on Redox Homeostasis and Sperm Motility in Bull Semen. *Journal of Animal Reproduction Science*, 218, 106567.
- Riwanti, P., Izazih, F., & Amaliyah, A. (2020). Pengaruh perbedaan konsentrasi etanol pada kadar flavonoid total ekstrak etanol 50, 70 dan 96% *Sargassum polycystum* dari Madura. *Journal of Pharmaceutical Care Anwar Medika (J-PhAM)*, 2(2), 82-95.
- Rizkiawati, R. & Ernawati. (2025). Analysis Of Environmental Factors on Human Sperm Viability in Modern Clinical Reproduction Laboratory. *Jurnal Medicare*, 4(3), 388-398.
- Saefudding, S., Khaeruddin, K., & Syamsuryadi, B. (2023). Kualitas Spermatozoa Ayam Bangkok dalam Pengencer Ringer Laktat dan Air Kelapa yang Disuplementasi Kuning Telur dan Glukosa. *Anoa: Journal of Animal Husbandry*, 2(2), 71-79.
- Safitri, E. I., Fithria, R. F., Saputro, E. W., & Wijaya, D. Y. (2021). Uji Potensi Antijerawat Secara *In vitro* dan *Ex Vivo* dari Ekstrak Etanol Herba Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 19(2), 254-261.
- Sajimin. (2011). *Medicago sativa* L. (Alfalfa) Sebagai Tanaman Pakan Ternak Harapan Di Indonesia. *Wartazoa*, 21(2), 91–98.
- Scibior, D., & Czeczot, H. (2006). Katalaza–budowa, właściwości, funkcje [Catalase: structure, properties, functions]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 60, 170-180.
- Seddiki, Y., da Silva, F. M., Silva, F. M. (2017). Antioxidant properties of polyphenols and their potential use in improvement of male fertility: a review. *Biomed J Sci Tech Res*, 1(3), 612-617.
- Shari, A. (2022). Seleksi Spermatozoa Pada Fertilisasi In Vitro (IVF). *Indonesian Journal of Health Science*, 2(1), 1-8.
- Shiddieqy, T.M. Hasbi Ash-. (1961). *Tafsir Al-Qur'anul Majid An-Nuur*. Diterjemahkan oleh Shiddiqi, N., dkk. (2000). Semarang: PT. Pustaka Rizki Putra.
- Shihab, M.Q. 2002. *Tafsir al-Misbah: Pesan, Kesan dan Keserasian Al-Qu'ran*. Jakarta: Lentera Hati.
- Sholihin, A., & Ducha, N. (2024). Pengaruh Kemangi (*Ocimum basilicum*) Terhadap Kualitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus*) yang Diberikan Paparan Asap Rokok. *LenteraBio: Berkala Ilmiah Biologi*, 13(2), 289-299.
- Sinata, N., Pratiwi, I. D., Muhtadi, W. K. (2023). Uji aktivitas antidiabetes infusa daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.) terhadap kadar glukosa darah mencit putih (*Mus Musculus* L.) jantan yang diinduksi glukosa. *Lumbung Farmasi: Jurnal Ilmu Kefarmasian*, 4(1), 33-40.
- Suherman, C. (2009). *Mengenal Tumbuhan Alfalfa*. Tangerang: Talenta Pustaka Indonesia.
- Susilowati, S., & Rosyidah, Y. (2008). Efek Antiinflamasi Ekstrak Etanolik Herba Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Pada Tikus Jantan yang Diinduksi Karagenin

- Beserta Identifikasi Kandungan Senyawa Aktifnya. *Jurnal Ilmu Farmasi dan Farmasi Klinik*, 5(1), 6-8.
- Susilowati, S., Mustofa, I., Wurlina, W., Hernawati, T., Oktanella, Y., Soeharsono, S., & Purwanto, D. A. (2022). Green tea extract in the extender improved the post-thawed semen quality and decreased amino acid mutation of Kacang buck sperm. *Veterinary sciences*, 9(8), 403.
- Thompson, A., Agarwal, A., & Du Plessis, S. S. (2013). Physiological role of reactive oxygen species in sperm function: a review. *Antioxidants in male infertility: a guide for clinicians and researchers*. New York, USA: Springer Science and Business Media, 69-89.
- Triyani, R. S., Zaenuri, L. A., Sumadiasa, I. W. L., & HY, L. (2024). Preservation of Boer Cross Buck Spermatozoa Motility and Viability in Tris Albumin Extender Supplemented with Fig Fruit Filtrates in Cold Temperature Storage. *Jurnal Biologi Tropis*, 24(1b), 380-389.
- Ulkhak, M. A. D., Firmansyah, L., & Kurniatsnaini, N. (2023). Pengaruh Antioksidan Ekstrak Buah Kepel terhadap Kualitas Sperma Hewan Coba yang Diberikan Asap Rokok. *Health Information: Jurnal Penelitian*, e1173-e1173.
- Van Tran, L., Malla, B. A., Kumar, S., & Tyagi, A. K. (2016). Polyunsaturated Fatty Acids in Male Ruminant Reproduction. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 30(5), 622.
- Villaverde, A. I. S. B., Netherton, J., & Baker, M. A. (2019). From Past to Present: The Link Between Reactive Oxygen Species in Sperm and Male Infertility. *Antioxidants*, 8(12), 616.
- Wahdaniah, W., Erika, M., & Purwaningsih, I. (2020). Aktivitas Antioksidan Fraksi Metanol Daun Jeringau Merah (*Acorus* Sp.) Metode DPPH. *Jurnal Laboratorium Khatulistiwa*, 4(1), 26-33.
- Walczak–Jedrejowska, R., Wolski, J. K., & Slowikowska–Hilczer, J. (2013). The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Central European journal of urology*, 66(1), 60.
- Wang, T. Y., Li, Q., & Bi, K. S. (2018). Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, 13(1), 12-23.
- Wang, Y., Fu, X., Li, H. (2025). Mechanisms of oxidative stress-induced sperm dysfunction. *Frontiers in endocrinology*, 16, 1520835.
- Widiasriani, I. A. P., Udayani, N. N. W., Triansyah, G. A. P., Dewi, N. P. E. M. K., Wulandari, N. L. W. E., & Prabandari, A. A. S. S. (2024). Artikel Review: Peran Antioksidan Flavonoid dalam Menghambat Radikal Bebas. *Journal Syifa Sciences and Clinical Research*, 6(2).
- Widyati-Slamet, Anwar, S., & Widjanto, D. W. (2014). Pertumbuhan generatif alfalfa (*Medicago sativa* L.) mutan tropis, respon terhadap pemupukan fosfat (hasil mutasi induksi EMS). *Pastura*, 3(2), 61–64.
- Widyowati, H., Ulfah, M., Sumantri (2014). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanolik Herba Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Dengan Metode Dpph (1, 1-difenil-2-pikrilhidrazil). *Jurnal Ilmu Farmasi dan Farmasi Klinik*, 25-33.
- Wijayanti A, Suprayogi TW, Prastiya RA, Hernawati T, Sardjito T, Saputro AL, Amaliya A, Sulistyowati D. (2023). Pengaruh Penambahan Ekstrak Teh Hijau (*Camellia sinensis*) dalam Diluter Tris Kuning Telur Terhadap

- Kualitas Spermatozoa Sapi Bali (*Bos sondaicus*) Setelah Pembekuan. *J. Med. Vet.* 6(1): 66-74.
- Wiyanti, D. C., Isnaini, N., & Trisunuwati, P. (2013). Pengaruh lama simpan semen dalam pengencer NaCl fisiologis pada suhu kamar terhadap kualitas spermatozoa ayam kampung (*Gallus domesticus*). *Jurnal Kedokteran Hewan*. Vol, 7(1).
- Yilmazer, Y., Moshfeghi, E., Cetin, F., & Findikli, N. (2024). *In vitro* Effects of The Combination of Serotonin, Selenium, Zinc, and Vitamins D and E Supplementation on Human Sperm Motility and Reactive Oxygen Species Production. *Zygote*, 32(2), 154-160.
- Yuhernita, Y., & Juniarti, J. (2011). Analisis Senyawa Metabolit Sekunder Dari Ekstrak Metanol Daun Surian Yang Berpotensi Sebagai Antioksidan. *Makara Journal of Science*, 15(1), 27.
- Yulianti, W., Ayuningtiyas, G., Martini, R., & Resmeiliana, I. (2020). Pengaruh Metode Ekstraksi Dan Polaritas Pelarut Terhadap. *Jurnal Sains Terapan*. 10(2), 41-49.
- Yulnawati dan Setiadi, M. A. (2014). Motilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa epididimis kucing selama penyimpanan pada suhu 4 C. *Media Kedokteran Hewan*, 21(3).
- Yumte, K., Wantouw, B., & de Queljoe, E. (2013). Perbedaan Motilitas Spermatozoa Sapi Janta (*Frisian Holstein*) Setelah Pemberian Cairan Kristaloid-ringer Laktat. *eBiomedik*, 1(1).
- Yuniar, R. M., Kusumawati, A., & Setyawan, E. M. N. (2024). Efek Penambahan Antioksidan Selenium, Kurkumin Dan Kombinasinya Terhadap Motilitas, Recovery Rate Dan Viabilitas Spermatozoa Pada Kriopreservasi Semen Sapi Peranakan Ongole. *Jurnal Sain Veteriner*, 42(3), 389-399.
- Yuslianti ER, (2018). *Pengantar Radikal Bebas dan Antioksidan*. Yogyakarta: Deepublish.
- Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques For Extraction and Isolation of Natural Products: A Comprehensive Review. *Chinese medicine*, 13(1), 20.
- Zhu, X. Y., Lin, H. M., Xie, J., Chen, S. S. And Wang, P. (2011). Homogenate Extraction of Isoflavones from Soybean Meal by Orthogonal Design. *Journal of Scientific and Industrial Research*. Vol. 70 (6): 455-460.
- Zuraida, Z., Sulistiyani. S., Sajuthi, D., Suparto, IH. (2017). Fenol, Flavonoid, dan Aktivitas Antioksidan pada Ekstrak Kulit Batang Pulau (*Alstonia scholaris* R. Br). *Jurnal Penelitian Hasil Hutan*; 35(3): 211-219.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Tabel Perhitungan Rerata Motilitas

Perlakuan	Waktu	Ulangan (Motilitas)						Total	Rerata	Delta
		1	2	3	4	5	6			
E0	0	65.18	63.59	54.69	67.14	70.00	73.58	394.19	65.70	6.83
	30	59.72	63.06	51.72	57.14	55.75	65.85	353.24	58.87	
E1	0	66.20	66.15	63.50	65.92	74.36	64.50	400.63	66.77	4.60
	30	65.35	61.36	60.59	61.76	64.18	59.78	373.03	62.17	
E2	0	63.83	58.68	65.12	59.34	62.07	58.73	367.76	61.29	2.97
	30	63.60	55.31	59.32	57.89	59.04	54.76	349.92	58.32	
E3	0	70.57	69.58	64.22	62.42	69.23	60.00	396.02	66.00	4.27
	30	66.36	63.80	61.44	58.73	60.55	59.50	370.38	61.73	

Lampiran 2. Analisis Motilitas secara statistik

Uji Normalitas

Tests of Normality							
	Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Motilitas	E0	.115	6	.200 [*]	.988	6	.984
	E1	.309	6	.076	.895	6	.348
	E2	.179	6	.200 [*]	.982	6	.962
	E3	.175	6	.200 [*]	.982	6	.961

*. This is a lower bound of the true significance.
a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas

Tests of Homogeneity of Variances					
		Levene	df1	df2	Sig.
		Statistic			
Motilitas	Based on Mean	1.649	3	20	.210
	Based on Median	1.629	3	20	.214
	Based on Median and with adjusted df	1.629	3	16.229	.222
	Based on trimmed mean	1.645	3	20	.211

Uji ANOVA

ANOVA

Motilitas					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	46.136	3	15.379	1.349	.287
Within Groups	228.039	20	11.402		
Total	274.174	23			

Hasil ANOVA pengaruh ekstrak etanol 70% alfalfa (*Medicago sativa* L.) terhadap motilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus*) pada $\alpha = 5\%$

SK	DB	JK	KT	F-hitung	F-Tabel 5%
Selisih Perlakuan	3	46.14	15.38	1.35	3,10
Galat	20	228.04	11.40		
Total	23	274.17			

Lampiran 3. Tabel Perhitungan Rerata Viabilitas

Perlakuan	Waktu	Ulangan						Total	Rerata	Delta
		1	2	3	4	5	6			
E0	0	65.55	64.68	58.21	62.00	67.14	69.23	386.81	64.47	8.38
	30	56.88	56.96	51.79	52.54	58.33	60.00	336.51	56.08	
E1	0	71.93	60.98	63.58	73.68	64.55	68.12	402.83	67.14	5.40
	30	69.05	58.11	56.32	67.05	60.32	59.57	370.41	61.74	
E2	0	64.29	65.93	61.36	72.92	65.91	69.79	400.20	66.70	3.88
	30	61.54	64.10	55.93	68.75	63.41	63.16	376.90	62.82	
E3	0	71.05	67.80	70.00	70.73	66.04	63.16	408.78	68.13	7.16
	30	66.67	59.62	64.00	63.89	57.78	53.85	365.79	60.97	

Lampiran 4. Analisis Viabilitas secara Statistik Uji Normalitas

Tests of Normality

	Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Viabilitas	E0	.266	6	.200 [*]	.888	6	.309
	E1	.196	6	.200 [*]	.893	6	.336
	E2	.228	6	.200 [*]	.933	6	.606
	E3	.215	6	.200 [*]	.959	6	.811

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas

Tests of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Viabilitas	Based on Mean	2.361	3	20	.102
	Based on Median	2.142	3	20	.127
	Based on Median and with adjusted df	2.142	3	19.471	.128
	Based on trimmed mean	2.385	3	20	.100

Uji ANOVA

ANOVA

Viabilitas					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	70.221	3	23.407	6.798	.002
Within Groups	68.866	20	3.443		
Total	139.087	23			

Uji lanjut menggunakan DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*)

Viabilitas

	Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Tukey HSD ^a	E2	6	3.8833		
	E1	6	5.4033	5.4033	
	E3	6		7.1633	
	E0	6		8.3850	
	Sig.		.503	.052	
Duncan ^a	E2	6	3.8833		
	E1	6	5.4033	5.4033	
	E3	6		7.1633	7.1633
	E0	6			8.3850
	Sig.		.171	.116	.268

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

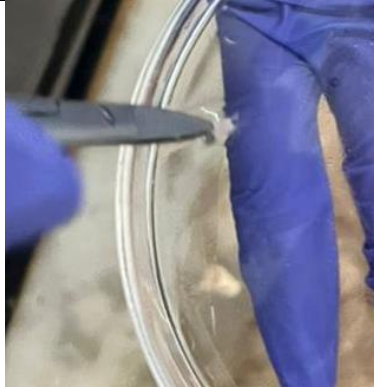
Hasil ANOVA pengaruh ekstrak etanol 70% alfalfa (*Medicago sativa* L.) terhadap viabilitas spermatozoa mencit (*Mus musculus*) pada $\alpha = 5\%$

SK	DB	JK	KT	F-Hitung	F-Tabel 5%
Selisih Perlakuan	3	70.22	23.41	6.80	3.10
Galat	20	68.87	3.44		
Total	23	139.09			

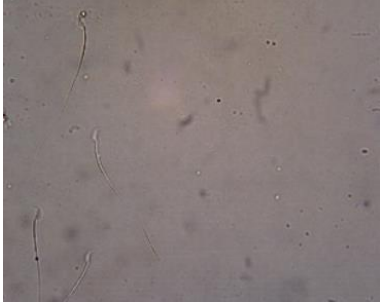
Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian Proses Ekstraksi

 Simplisia alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.)	 Penimbangan simplisia alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.)	 Pencampuran simplisia dengan etanol 70% sebanyak
 Proses maserasi simplisia dalam etanol 70%	 Penyimpanan dan perendaman simplisia selama proses maserasi	 Penyaringan hasil maserasi menggunakan corong Buchner
 Penguapan pelarut menggunakan Rotary Evaporator	 Ekstrak kental alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.) hasil evaporasi	

Proses isolasi Spermatozoa *Mus musculus*

 Pembedahan mencit dengan dislokasi	 Identifikasi dan pengambilan saluran reproduksi jantan
 Isolasi cauda epididimis	 Pencacahan cauda epididimis menggunakan gunting bedah untuk memperoleh suspensi spermatozoa

Hasil Pengamatan

Motilitas	Viabilitas
	 a. Spermatozoa hidup berwarna transparan b. Spermatozoa mati berwarna gelap



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG

Jalan Gajayana Nomor 50, Telepon (0341)551354, Fax. (0341) 572533
Website: <http://www.uin-malang.ac.id> Email: info@uin-malang.ac.id

JURNAL BIMBINGAN SKRIPSI/TESIS/DISERTASI

IDENTITAS MAHASISWA

NIM : 220602110126
Nama : SHOFIA AZZAHRA
Fakultas : SAINS DAN TEKNOLOGI
Jurusan : BIOLOGI
Dosen Pembimbing 1 : Kholifah Holil, M.Si
Dosen Pembimbing 2 : DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si
Judul Skripsi/Tesis/Disertasi : Pengaruh Ekstrak Etanol 70% Herbal Alfafa (Medicago sativa L.) Terhadap Motilitas Dan Viabilitas Sperma Kambing Peranakan Etawa Secara In Vitro

IDENTITAS BIMBINGAN

No	Tanggal Bimbingan	Nama Pembimbing	Deskripsi Proses Bimbingan	Tahun Akademik	Status
1	21 Februari 2025	Kholifah Holil, M.Si	konsultasi terkait topik penelitian	Genap 2025/2026	Sudah Dikoreksi
2	26 Agustus 2025	Kholifah Holil, M.Si	Konsultasi revisi judul, rumusan masalah, tujuan, manfaat dan batasan masalah	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
3	02 September 2025	Kholifah Holil, M.Si	Konsultasi metode penelitian	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
4	16 September 2025	Kholifah Holil, M.Si	Konsultasi revisi metode penelitian dan konsultasi latar belakang	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
5	22 September 2025	DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si	Pengantar penulisan integrasi Al - Qur'an dan Sains	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
6	26 September 2025	Kholifah Holil, M.Si	Konsultasi revisi metode penelitian	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
7	03 Oktober 2025	Kholifah Holil, M.Si	Konsultasi revisi latar belakang	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
8	07 Oktober 2025	DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si	Konsultasi penulisan integrasi Al-Qur'an Sains pada latar belakang	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
9	08 Oktober 2025	DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si	Konsultasi revisi penulisan integrasi Al-Qur'an Sains pada latar belakang	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
10	09 Oktober 2025	DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si	Konsultasi revisi penulisan integrasi Al-Qur'an Sains pada latar belakang	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
11	10 Oktober 2025	Kholifah Holil, M.Si	Konsultasi revisi latar belakang	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
12	13 Oktober 2025	Kholifah Holil, M.Si	Konsultasi terkait Tinjauan Pustaka	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
13	14 Oktober 2025	DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si	Konsultasi Integrasi Al-Qur'an Sains pada Tinjauan pustaka	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
14	15 Oktober 2025	DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si	Konsultasi revisi Integrasi Al-Qur'an dan Sains pada Tinjauan pustaka	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
15	18 November 2025	Kholifah Holil, M.Si	Konsultasi penelitian	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
16	21 November 2025	Kholifah Holil, M.Si	Konsultasi Penelitian	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
17	26 November 2025	Kholifah Holil, M.Si	Konsultasi penelitian	Ganjil 2025/2026	Sudah Dikoreksi
18	29 April 2026	Kholifah Holil, M.Si	Bimbingan Pembahasan	Genap 2026/2027	Sudah Dikoreksi

19	07 Mei 2026	Kholifah Holil, M.Si	Revisi pembahasan	Genap 2026/2027	Sudah Dikoreksi
20	08 Mei 2026	DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si	Konsultasi Integrasi	Genap 2026/2027	Sudah Dikoreksi
21	11 Mei 2026	DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si	Revisi integrasi bab 4	Genap 2026/2027	Sudah Dikoreksi
22	11 Mei 2026	Kholifah Holil, M.Si	Revisi pembahasan	Genap 2026/2027	Sudah Dikoreksi
23	19 Mei 2026	DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si	Revisi integrasi bab 4	Genap 2026/2027	Sudah Dikoreksi
24	20 Mei 2026	DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si	ACC Integrasi Bab 4	Genap 2026/2027	Sudah Dikoreksi
25	26 Mei 2026	Kholifah Holil, M.Si	Bimbingan Abstrak dan revisi hasil pembahasan	Genap 2026/2027	Sudah Dikoreksi

Telah disetujui
Untuk mengajukan ujian Skripsi/Tesis/Desertasi

Dosen Pembimbing 2



DIDIK WAHYUDI, S.Si., M.Si

Malang, _____

Dosen Pembimbing 1



Kholifah Holil, M.Si



Sugiyatni, M.Si



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
PROGRAM STUDI BIOLOGI

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

Form Checklist Plagiasi

Nama : Shofia Azzahra
NIM : 220602110126
Judul : Pengaruh Ekstrak Etanol 70% Alfalfa (*Medicago sativa* L.) sebagai sumber antioksidan terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa *Mus musculus*

No	Tim Check plagiasi	Skor Plagiasi	TTD
1	Azizatur Rohmah, M.Sc	25 %	
2	Berry Fakhry Hanifa, M.Sc		
3	Bayu Agung Prahardika, M.Si		
4	Tyas Nyonita Punjungsari, M.Sc		
5	Maharani Retna Duhita, M.Sc., PhD.Med.Sc		

Mengetahui,

Ketua Program Studi Biologi



Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si
NIP. 19671113 199402 2 001